

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

**NUEVAS ESTRATEGIAS EN LA PURIFICACION
Y RECONSTITUCION DE LAS PROTEINAS
Y LIPIDOS DE MIELINA**

RICARDO S. DIAZ LOPEZ

Director: JAIME MONREAL LLOP
Instituto Cajal
C.S.I.C.

Presidente Sr. Dr.

Presidente: Sr. Dr.

Vocal: Sr. Dr.

Vocal: Sr. Dr.

Vocal: Sr. Dr.

Secretario: Sr. Dr.

TRIBUNAL

MADRID, MAYO DE 1992

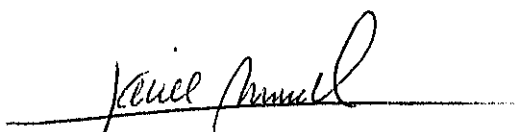
D. Jaime Monreal Llop, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y adscrito al Instituto Cajal,

CERTIFICA:

Que el Licenciado en Farmacia, D. Ricardo S. Díaz López, ha realizado bajo mi dirección, en el Instituto Cajal del CSIC y desde 1988, los trabajos experimentales conducentes a la elaboración de su Tesis Doctoral titulada: *Nuevas estrategias en la purificación y reconstitución de las proteínas y lípidos de mielina*.

Considero que tanto el contenido científico como la presentación de su memoria reúnen las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que conste ante quien proceda, firmo el presente en Madrid a veintiseis de Mayo de mil novecientos noventa y dos.



El Director de la Tesis
Fdo: Jaime Monreal Llop



Tesis Doctoral presentada por:
Ricardo S. Díaz López

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a cuantas personas y entidades han contribuido al logro del presente trabajo, y de manera especial a:

El Dr. Jaime Monreal, Investigador Científico del C.S.I.C. en el Instituto Cajal y director de esta Tesis, por todas sus enseñanzas, consejos y apoyo constante.

El Dr. Pedro Carmona, Investigador Científico del C.S.I.C. en el Instituto de Óptica, por su ayuda y cooperación en los análisis de estructura secundaria de proteínas por Espectroscopía Infrarroja.

Al Prof. Dr. Miguel Lucas, Jefe del Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario de Sevilla, por la colaboración y apoyo prestados en los estudios de transporte iónico a través de membrana.

Al Dr. Carlos J. Tandler y la Dra. Marta Avelaño, por sus magníficos consejos.

A mis compañeros y amigos Pilar Regueiro y Julio Pérez, por su colaboración desinteresada en la técnicas de Microscopía Electrónica.

A la Prof. Dra. Evangelina Palacios, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la U.C.M., por su tutoría y orientaciones durante los estudios de doctorado.

A la Caja de Madrid y la Comunidad Autónoma de Madrid, por el apoyo financiero que ha permitido la consecución de este trabajo.

Al Instituto Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por acogerme y permitirme llevar a cabo el trabajo experimental.

INDICE

CAPITULO I - INTRODUCCION GENERAL, ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION.

PREFACIO	2
COMPOSICION BIOQUIMICA DE LA MIELINA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	4
1.- Composición lipídica	4
1.1.- <i>La matriz lipídica de la membrana miélnica</i>	10
2.- Composición proteica	11
2.1.- <i>Proteína básica</i>	12
2.1.1.- <u>Secuencia y microheterogeneidad</u>	12
2.1.2.- <u>Fosforilación</u>	14
2.1.3.- <u>Metilación</u>	15
2.1.4.- <u>Glicosilación</u>	16
2.1.5.- <u>Isoformas</u>	16
2.1.6.- <u>Estructuras secundaria y terciaria</u>	17
2.1.7.- <u>Actividad encefalitogénica</u>	18
2.2.- <i>Proteínas proteolipídicas</i>	18
2.2.1.- <u>Estructura primaria: isoformas</u>	20
2.2.2.- <u>Acilación</u>	22
2.2.3.- <u>Estructura secundaria</u>	23
2.2.4.- <u>Disposición del PLP en la membrana</u>	24
2.2.5.- <u>Funciones del PLP en la mielina</u>	27
2.2.6.- <u>Biología Molecular e implicación del PLP en patologías desmielinizantes</u>	28
2.2.7.- <u>Encefalitis alérgica experimental y enfermedades humanas desmielinizantes: esclerosis múltiple</u>	29
2.3.- <i>Glicoproteína asociada a mielina</i>	31
2.4.- <i>Enzimas y receptores asociados a mielina</i>	33
2.4.1.- <u>Enzimas asociadas a mielina</u>	34

a) 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa)	38
b) Hidrolasa de ésteres de colesterol (pH= 7.2)	40
c) Anhidrasa carbónica	40
d) 5'-nucleotidasa	41
e) Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa	41
f) Calpaína II	42
2.4.2.- <u>Receptores detectados en mielina</u>	43
2.5.- <i>Otras proteínas minoritarias de mielina</i>	44
2.5.1.- <u>Plasmolipina</u>	44
2.5.2.- <u>MOSP</u>	44
2.5.3.- <u>MOG</u>	45
2.5.4.- <u>BT57.5</u>	45
2.5.5.- <u>Lectina Soluble Cerebelar</u>	45
2.5.6.- <u>Tubulina</u>	46
ORIGEN Y ESTRUCTURA DE LA VAINA DE MIELINA DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	47
1.- El oligodendrocito	48
2.- Maduración de los oligodendrocitos	50
3.- La mielinogénesis en el SNC	52
4.- Formación y estructura de la vaina de mielina	54
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	56
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	63
<hr/>	
<u>CAPITULO II.- PURIFICACION DE LA MEMBRANA MIELINICA DEL CEREbro. CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y BIOQUIMICA</u>	
<hr/>	
INTRODUCCION	78
MATERIALES Y METODOS	80
Materiales	80
Purificación de la membrana mielínica	80
Microscopía electrónica (secciones ultrafinas)	81
Caracterización analítica de la membrana purificada	82

Cromatografía en capa fina de lípidos polares y neutros	83
Electroforesis de las proteínas	84
Determinaciones enzimáticas	85
RESULTADOS Y DISCUSION	90
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	99

CAPITULO III.- PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE MIELINA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA EN FASE REVERSA (RP-HPLC)

INTRODUCCION	102
MATERIALES Y METODOS	105
Solventes y reactivos químicos	105
Materiales biológicos	105
Cálculo del índice de polaridad (P') en las mezclas de solventes	106
Ensayos de solubilidad	107
Electroforesis	107
Cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC)	109
Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC)	109
Determinaciones analíticas	111
RESULTADOS	112
Solubilidad de los proteolípidos en solventes orgánicos	112
Solubilidad de los proteolípidos en mezclas de tetrahidrofurano (THF) y agua	114
Solubilidad de las proteínas de mielina en mezclas de THF y agua	116
Extracción de la sustancia blanca de cerebro con mezclas de THF y agua. Efecto de la composición del solvente	118
Purificación de las proteínas de mielina por RP-HPLC a escala analítica	121
Purificación de las proteínas de mielina por RP-HPLC a escala semipreparativa	132
Purificación de la proteína básica a partir del extracto crudo de sustancia blanca	134

DISCUSION	142
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	149

CAPITULO IV.- SOLUBILIZACION Y PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE MIELINA CON DETERGENTES

INTRODUCCION	154
--------------------	-----

PRIMERA PARTE: Solubilización de la membrana mielínica de SNC con detergentes. Efecto del octilglucósido sobre la estructura secundaria de las proteínas de mielina, estudiado por Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR).

MATERIALES Y METODOS	157
----------------------------	-----

Materiales	157
Purificación de la membrana mielínica	157
Ensayos de solubilización	158
Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	158
Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	159
Microscopía electrónica (secciones ultrafinas)	161

RESULTADOS	162
------------------	-----

Solubilización comparativa de los componentes de mielina en varios detergentes	162
Efecto de la temperatura	162
Efecto de la fuerza iónica del medio	166
Estructura secundaria de las proteínas en detergente	171

DISCUSION	177
-----------------	-----

SEGUNDA PARTE: Purificación de los proteolípidos de mielina con detergentes. Caracterización por Cromatografía Líquida de alta Eficacia de Exclusión Molecular (SE-HPLC)

MATERIALES Y METODOS	186
----------------------------	-----

Materiales	186
Purificación de la membrana mielínica	186
Ensayos de delipidación	186
Análisis de proteína y lípidos	187
Solubilización de la mielina delipidada	188

Cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC)	188
Electroforesis de las proteínas	189
Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC)	189
HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC) de las proteínas solubilizadas	190
RESULTADOS	192
Delipidación de la mielina con sales biliares y derivados.	
Efecto de la fuerza iónica del medio	192
Efecto de la concentración de CHAPS	195
Delipidación de la mielina con CHAPS a temperatura ambiente	195
Delipidación a 4 °C	197
Efecto del pH del medio	197
Análisis cualitativo de los lípidos residuales	200
Fraccionamiento de las proteínas de mielina	202
SE-HPLC de los proteolípidos extraídos con octilglucósido	204
DISCUSION	212
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	222

CAPITULO V.- EXTRACCION DE LOS LIPIDOS TOTALES DE MIELINA, LIBRES DE PROTEINA. PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS.

INTRODUCCION	226
MATERIALES Y METODOS	228
Materiales	228
Preparación de los extractos lipídicos totales	228
Caracterización analítica del extracto lipídico total (ELT)	229
Cromatografía en capa fina de lípidos polares	230
Cromatografía en capa fina de gangliósidos	232
Cromatografía en capa fina de lípidos neutros	232
Preparación de liposomas a partir del ELT	233
Microscopía electrónica (tinción negativa y criofractura)	234
Agregación de liposomas inducida por proteína básica	234

Determinación de la permeabilidad de las membranas liposomales usando isótopos radioactivos	235
Determinación de la permeabilidad de las membranas liposomales usando sondas fluorescentes	240
RESULTADOS	241
Optimización de las condiciones para la extracción lipídica	241
Análisis cualitativo de los lípidos polares del ELT	241
Análisis cuantitativo de los lípidos del ELT	243
Caracterización de los lípidos neutros del ELT	246
Caracterización morfológica de los liposomas preparados con ELT	254
Permeabilidad de la membrana de los liposomas preparados con ELT	254
Interacción de la proteína básica de mielina con liposomas de ELT	258
DISCUSION	260
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	266

CAPITULO VI.- RECONSTITUCION DE LOS PROTEOLIPIDOS EN LIPOSOMAS DE ELT. EFECTOS SOBRE LA PERMEABILIDAD AL ION Ca^{2+} .

INTRODUCCION	271
MATERIALES Y METODOS	273
Materiales	273
Preparación del extracto lipídico total (ELT)	273
Purificación de la apoproteína proteolipídica (PLA)	273
Preparación de liposomas de ELT y reconstitución de los proteolípidos	274
Microscopía electrónica de criofractura	275
Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	275
Determinación de volúmenes intraliposomales con [^{14}C]-sacarosa	275
Determinación de flujos de calcio en liposomas y proteoliposomas	276
RESULTADOS	277

Purificación de los apoproteolípidos	277
Caracterización morfológica de los proteoliposomas	277
Estructura secundaria del proteolípido reconstituido	277
Modificación de la permeabilidad al Ca^{2+} de la membrana liposomal inducida por los proteolípidos	282
DISCUSION	291
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	297

CAPITULO VII.- CONCLUSIONES	302
--	------------

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL, ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

PREFACIO

En el curso de la evolución, los organismos han evolucionado en complejidad adquiriendo una serie de mecanismos que les permiten reaccionar eficazmente frente a las influencias externas. Los sistemas nerviosos central (SNC) y periférico (SNP) adquieren particular importancia en este contexto, ya que permiten que la información sea transmitida a alta velocidad entre las células nerviosas (neuronas) y los órganos diana mediante las fibras nerviosas (axones). Pero además de las neuronas también se desarrolló la neuroglia. Forma el tejido de sostén para las neuronas, e incluye la astroglia y la oligodendroglia. El desarrollo de un sistema de aislamiento eléctrico para las fibras nerviosas, en forma de una vaina de mielina fabricada por los oligodendrocitos, fue un paso decisivo en la evolución. Para los axones no mielinizados, la velocidad de transmisión del impulso nervioso es proporcional al diámetro del axón. En fibras mielinizadas la transmisión es hasta cien veces más rápida: el diámetro del axón puede así ser reducido muy significativamente sin perder eficacia en la velocidad de transmisión.

La vaina que rodea los axones del SNC fue descrita por primera vez por Virchow en 1854 (1), quien la llamó mielina (del griego *myelos*, médula). En 1871, Ranvier observó al microscopio óptico discontinuidades en la vaina de mielina a intervalos de 1-2 μm , que todavía son llamados nodos de Ranvier (2). Aquí los axones están descubiertos y poseen mayores concentraciones de las bombas Na^+/K^+ , necesitadas para restaurar el potencial de acción. La alta velocidad de transmisión no se alcanza por despolarización continua, como es el caso de los axones no mielinizados, sino de manera saltatoria desde un nodo hasta el siguiente sobre la región internodal. Como la despolarización sólo ocurre localmente en los nodos de Ranvier, se ahorra una cantidad de energía considerable durante la repolarización.

Al conocimiento del papel fisiológico que juega una estructura tan

característica como la vaina de mielina se llega a través del estudio detallado de sus componentes moleculares, su organización en la membrana y sus interacciones, así como de su morfogénesis. En esta sección se resumirá el conocimiento que hasta ahora se posee sobre todos estos aspectos, referentes a la membrana mielínica del sistema nervioso central.

COMPOSICION BIOQUIMICA DE LA MIELINA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El hecho más característico de la composición bioquímica de la membrana mielínica con respecto a otras membranas plasmáticas o intracelulares es su alta relación lípido/proteína. Dependiendo de las especies, contiene 70-85% de lípidos y 15-30% de proteína. La mielina, *in situ*, tiene así mismo un bajo contenido en agua, aproximadamente de un 40%.

Aunque en un principio se pensó que la composición proteica de la membrana mielínica era bastante simple, en años recientes se han ido descubriendo proteínas minoritarias desde el punto de vista cuantitativo, pero de gran importancia desde el punto de vista funcional. A ello hay que añadir una peculiar composición lipídica, con abundancia de glicolípidos, plasmalógenos, colesterol y polifosfoinosítidos.

1.- Composición lipídica

En general, la membrana mielínica contiene todas las especies lipídicas encontradas en extractos de cerebro completo, con la única excepción del difosfatidilglicerol (cardiolipina), lípido específico de membrana mitocondrial. Así mismo, tampoco hay ningún lípido mielínico que no pueda ser encontrado en otra fracción subcelular del cerebro. Aunque en sentido estricto no se puede hablar de lípidos específicos de mielina, el galactocerebrósido, por su abundancia, es el más típico de esta membrana cuando se compara con otras fracciones de cerebro.

Además del galactocerebrósido, los lípidos principales de mielina son el colesterol y los plasmalógenos de etanolamina (glicerofosfolípidos que contienen una unión éter). Otro de los componentes lipídicos abundantes es la lecitina (fosfoglicérido de colina, fosfatidilcolina).

TABLA 1. Composición de la mielina de sistema nervioso central y del cerebro.

	Mielina			Sustancia blanca		Sustancia gris	Cerebro completo
	Hombre	Vaca	Rata	Hombre	Vaca	(Hombre)	(Rata)
Proteína total	30.0	24.7	29.5	39.0	39.5	55.3	56.9
Lípido total	70.0	75.3	70.5	54.9	55.0	32.7	37.0
Colesterol	27.7	28.1	27.3	27.5	23.6	22.0	23.0
Galactolípido total	27.5	29.3	31.5	26.4	28.6	7.3	21.3
Cerebrósidos	22.7	24.0	23.7	19.8	22.5	5.4	14.6
Sulfátidos	3.8	3.6	7.1	5.4	5.0	1.7	4.8
Fosfolípido total	43.1	43.0	44.0	45.9	46.3	69.5	57.6
PE	15.6	17.4	16.7	14.9	13.6	22.7	19.8
PC	11.2	10.9	11.3	12.8	12.9	26.7	22.0
PS	4.8	6.5	7.0	7.9	11.4	8.7	7.2
PI	0.6	0.8	1.2	0.9	0.9	2.7	2.4
Esfingomielina	7.9	7.1	3.2	7.7	6.7	6.9	3.8
Plasmalógeno	12.3	14.1	14.1	11.2	12.2	8.8	11.6

5

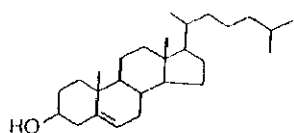
Los valores correspondientes a proteína y lípido totales se expresan como porcentajes de peso seco. El resto de los valores se expresan como porcentajes respecto al peso de lípido total. Abreviaturas: PE, PC, PS y PI; fosfoglicéridos de etanolamina, colina, serina e inositol, respectivamente. Adaptado de Norton y Cammer, 1984 (78).

Para la membrana mielínica del SNC de mamíferos, la relación molar colesterol:fosfolípido:galactolípido varía entre 2:2:1 y 4:3:2. Es, por tanto, el colesterol el que aporta la mayor parte de moléculas lipídicas en mielina, si bien los galactolípidos pueden representar una mayor proporción en peso.

Los lípidos de mielina constituyen gran parte de los lípidos totales de sustancia blanca. La composición lipídica de la sustancia gris del cerebro es, sin embargo, bastante distinta. En cerebro de mamíferos la composición lipídica de mielina es muy parecida en todas las especies estudiadas, aunque existen algunas diferencias. Por ejemplo, la mielina de rata tiene menos esfingomielina que la de cerebro bovino o humano. También existen variaciones regionales dentro del sistema nervioso central, siendo mayor la relación lípido/proteína en mielina procedente de médula espinal con respecto a la purificada a partir de cerebro.

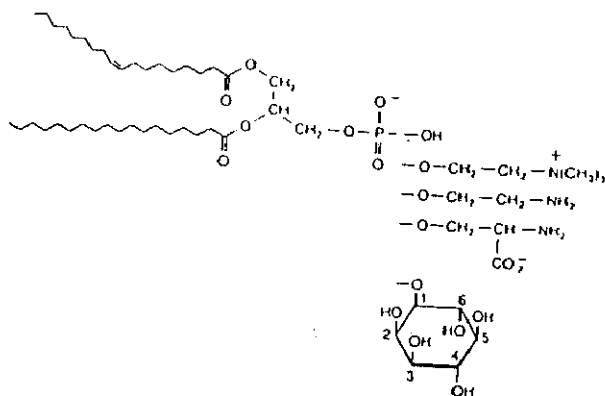
Además de la composición en cuanto a clases lipídicas, la composición de ácidos grasos de muchos de los lípidos individuales es altamente característica de esta membrana, especialmente en el caso de los galactoesfingolípidos. Así, las porciones hidrofóbicas de cerebrósidos y sulfátidos están constituidas por ácidos grasos extremadamente largos, desde C_{18} hasta C_{26} , predominando los de 24 átomos de carbono. Están presentes bien en su forma alfa-D-hidroxi saturada o bien en la forma n-9 monoeno insaturada (Stoffel, 1990 (3)), y se unen a la esfingosina mediante enlace amida formando la ceramida. El otro esfingolípido principal, la esfingomielina, no posee ácidos grasos alfa-hidroxilados, siendo los más abundantes 24:1, 18:0 y 24:0, además de pequeñas cantidades de otros residuos de cadena larga.

Respecto a la composición de residuos grasos de los fosfoglicéridos de mielina, ésta está caracterizada por una elevada proporción de aldehidos grasos. Proceden de los plasmalógenos, principalmente de la plasmeniletanolamina, y en menor proporción de la plasmenilserina. Los aldehidos se unen a la posición 1 del glicerol mediante enlaces enol éter o enlaces éter alfa,β insaturados, que son



ESTEROLES

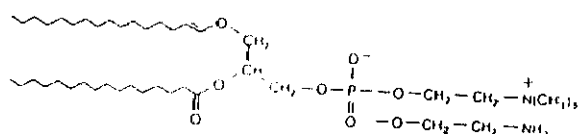
Coolesterol



FOSFOGLICERIDOS

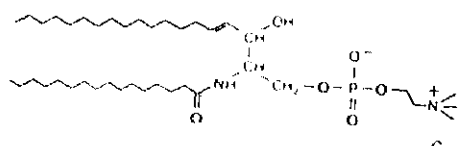
Acido fosfatídico (PA)
Fosfatidilcolina (PC)
Fosfatidiletanolamina (PE)
Fosfatidilserina (PS)

Fosfatidilinositol (PI)



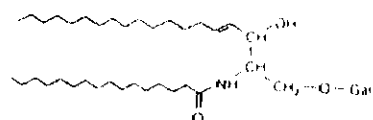
PLASMALOGENOS

Plasmenilcolina
Plasmeniletanolamina



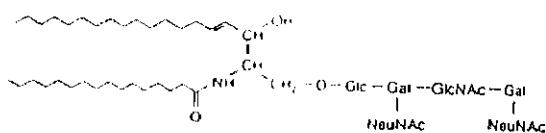
FOSFOESFINGOLIPIDOS

Esfingomieline



GLUCOESFINGOLIPIDOS

Galactocerebrósido



Gangliósido

Figura 1.- Estructura química de los componentes lipídicos principales de la membrana mielínica. Abreviaturas: Gal, galactosa; Glc, glucosa; NeuNAc, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico); GlcNAc, N-acetilglucosamina.

lábiles a la hidrólisis acídica. Constituyen en conjunto alrededor de la sexta parte de los residuos grasos totales de los fosfoglicéridos, y están integrados principalmente por los aldehidos palmítico, esteárico y oleico. Los aldehidos poliinsaturados están ausentes.

Los ácidos grasos de los plasmalógenos de etanolamina (unidos a la posición 2 del glicerol) son considerablemente más complejos e insaturados que los aldehidos. Son casi exclusivamente insaturados, siendo los más abundantes 18:1, 20:1, 20:4(n-6), 22:4(n-6) y 22:6(n-3). En el caso de los diacilfosfoglicéridos de etanolamina los residuos grasos contienen especies saturadas unidas, según se cree, a la posición 1 del glicerol. Los residuos insaturados se unen a la posición 2. Los ácidos grasos más abundantes son: 16:0, 18:0, 18:1, 20:1, 20:4(n-6) y 22:6(n-3).

Los fosfoglicéridos de colina contienen fundamentalmente los ácidos grasos 16:0, 18:0 y 18:1, y sólo una pequeña proporción de residuos poliinsaturados. Los fosfoglicéridos de serina tienen 18:0 y 18:1, una pequeña cantidad de 20:4 y trazas de otros residuos poliinsaturados. Con respecto a la sustancia gris de cerebro se puede decir que los fosfolípidos de mielina tienen mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados y menor cantidad de ácidos grasos saturados y poliinsaturados.

Aparte de los lípidos recogidos en la Tabla 1, existen varios otros de gran importancia. Si la mielina es extraída con solventes orgánicos neutros, no acidificados, los polifosfoinosítidos permanecen fuertemente unidos a la proteína mielínica y no aparecen en los análisis lipídicos. Sin embargo, el bifosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) representa un 4-6% del fósforo lipídico total de mielina, y el fosfato de fosfatidilinositol (PIP) el 1-1.5% (Morell *et al.*, 1989 (4)). En vista de que la mayor parte de los polifosfoinosítidos cerebrales se localizan en mielina, y teniendo en cuenta que la hidrólisis de estos lípidos catalizada por la fosfolipasa C es un mecanismo de transducción de señales extracelulares

ampliamente distribuido, se ha propuesto (Kahn y Morell, 1988 (5)) que la mielina pudiera servir como un reservorio de segundos mensajeros que podrían ser utilizados en sitios específicos tanto dentro como fuera de la vaina de mielina.

Junto a cerebrósidos y sulfátidos, existen varios galactolípidos neutros minoritarios entre los que se incluyen al menos tres ésteres de ácidos grasos y cerebrósido y dos glicolípidos derivados de glicerol (diacilglicerilgalactósido y monoalquilmonoacilglicerilgalactósido), que en conjunto reciben el nombre de galactosildiglicérido. Además, también se han descrito algunos alcanos de cadena larga y otros fosfolípidos, como el ácido fosfatídico, en pequeña proporción.

La mielina de mamíferos contiene entre 0.1 y 0.3% de gangliósidos (glicoesfingolípidos complejos que contienen ácido siálico), principalmente el monosialogangliósido GM1. Algunas especies, entre las que figuran los humanos, contienen un gangliósido específico de mielina, el GM4. La mielina es la única membrana de cerebro que posee un patrón característico de gangliósidos. Otras fracciones de membrana tienen un patrón similar al encontrado en extractos de cerebro completo, y contienen niveles mayores de polisialogangliósidos.

La composición lipídica tan característica de la membrana mielínica puede ser importante no sólo desde el punto de vista estructural, sino también desde el punto de vista funcional. Algunos lípidos abundantes o característicos de mielina participan en procesos asociados a membrana. Entre ellos destacan:

- a) Los polifosfoinosítidos, precursores de segundos mensajeros (IP_3 y diacilglicerol).
- b) Algunos fosfolípidos acídicos, con capacidad ionofórica para iones divalentes (Tyson et al., 1976 (6)).
- c) Varias enzimas unidas a membrana requieren la presencia de lípidos específicos para su actividad óptima.
- d) Los gangliósidos participan en fenómenos de adhesión celular,

regulación del crecimiento celular y en la unión a receptores específicos en la membrana plasmática.

e) Recientemente se ha demostrado que el galactocerebrósido participa en la apertura de canales de calcio en cultivos de oligodendrocitos (Dyer y Benjamins, 1990 (7)).

1.1.- *La matriz lipídica de la membrana mielínica*

El conjunto de la matriz lipídica de la membrana mielínica se dispone en forma de bicapa, al igual que en el resto de las membranas biológicas, aunque con un grosor inusual de unos 4.5-5 nm. Ello es debido en parte a la gran longitud de las cadenas de los ácidos grasos unidos a los glucoesfingolípidos (Stoffel, 1990 (3)).

Aunque todavía de manera no concluyente, se puede decir que las distintas clases lipídicas de mielina se distribuyen de manera asimétrica entre las monocapas externa (extracelular) e interna (citoplasmática) que componen la bicapa (Braun, 1984 (8)). Resumiendo, se pueden hacer tres generalizaciones:

a) El colesterol se distribuye preferencialmente en la monocapa extracelular; dos de cada tres moléculas totales de colesterol se localizan aquí, por lo que en esta monocapa existe una molécula de colesterol por cada molécula de otro lípido.

b) El galactocerebrósido se acumula en su mayor parte en la monocapa extracelular, y probablemente también los otros glucoesfingolípidos (sulfátidos y gangliósidos).

c) El fosfolípido mayoritario de mielina, el plasmalógeno de etanolamina, se localiza exclusivamente en la monocapa citoplasmática de la bicapa. Datos indirectos parecen indicar que los polifosfoinosítidos se localizan también en esta monocapa.

Tomando todas estas evidencias en su conjunto, se puede decir que la

monocapa extracelular de la bicapa estaría constituida casi exclusivamente por colesterol y glucoesfingolípidos en una proporción próxima a 1:1; los fosfolípidos se dispondría preferencialmente en la monocapa citosólica.

2.- Composición proteica

La composición proteica de la membrana mielínica es relativamente simple comparada con la de otras membranas biológicas, con tres fracciones principales que constituyen la mayor parte de la proteína total. Sin embargo, en años recientes se han ido descubriendo un gran número de proteínas minoritarias en términos cuantitativos, pero de gran importancia desde el punto de vista funcional, tales como enzimas relacionadas con fenómenos de transporte iónico o metabólicos, componentes de sistemas de transducción de señales extracelulares, receptores de neurotransmisores, proteínas de reconocimiento y adhesión celular, etc. Todos estos descubrimientos han ido desterrando el concepto tradicional que consideraba a la mielina como una membrana inerte, con la única función de aislante eléctrico para facilitar la transmisión saltatoria del impulso nervioso, y cada vez más se tiende a considerarla como una membrana biológica cualquiera, con funciones especializadas en cuanto a metabolismo, equilibrio iónico y relaciones con el medio extracelular.

En mielina de sistema nervioso central los dos componentes proteicos principales, que en conjunto suponen el 60-80% de la proteína total, son las proteínas proteolipídicas y las proteínas básicas. Ambas fueron aisladas a partir de cerebro completo o médula espinal, antes de disponerse de métodos de purificación de membrana mielínica, las primeras a partir de extractos de solventes orgánicos y las segundas con extractos acuosos acidificados. Una tercera fracción proteica, llamada en conjunto fracción Wolfgram, engloba varios polipéptidos de alto peso molecular (>40000), y fue primeramente diferenciada de las otras dos fracciones por sus distintas propiedades de solubilidad (insoluble

en agua y mezclas de cloroformo/ metanol, soluble en cloroformo/metanol acidificado). En un principio se pensó que las proteínas Wolfgram eran contaminantes procedentes de otras fracciones subcelulares del cerebro, pero ahora se tiene la certeza de que son componentes legítimos de mielina. Incluyen varias enzimas, tubulina y la glicoproteína asociada a mielina (MAG).

2.1.- *Proteína básica*

2.1.1.- Secuencia y microheterogeneidad

La proteína básica de mielina (MBP) es una proteína extrínseca, hidrosoluble, con un peso molecular de 18.5 KDa, que representa un 25-30% de la proteína total de mielina, y es la segunda proteína más abundante después de las proteínas proteolípídicas. Se localiza exclusivamente en los espacios citoplásmicos (líneas densas) de la vaina de mielina (Harris y Findlay, 1983 (9)). Contiene 170 aminoácidos que incluyen 12 lisinas, 19 argininas, 2 restos de ácido glutámico y 9 de ácido aspártico. Ello hace que la carga neta de la proteína sea de +20 a pH fisiológico y, consecuentemente, su punto isoeléctrico es alto (> 10). Contiene un único residuo de triptófano y ninguno de cisteína, por lo que carece de puentes disulfuro. Se ha secuenciado la proteína básica de varias especies, comprobándose un alto grado de conservación en la secuencia. Otros hechos propios de la estructura primaria de la MBP incluyen la acetilación del extremo N-terminal, varios sitios de fosforilación (serinas y treoninas), dos sitios aceptores del carbohidrato N-acetilgalactosamina (treoninas), un residuo de arginina metilado, dos sitios de desamidación, una posible pérdida de la arginina C-terminal, una región tripolina (residuos 99-101), y secuencias homólogas a las subunidades A y B de la toxina colérica, que podrían participar en uniones con el gangliósido GM1 y el ATP, así como la ADP ribosilación de la MBP (Deber y Reynolds, 1991 (10)).

Otro aspecto interesante de esta proteína es que la especie de 18.5 KDa

existe como varias formas químicas que han sido llamadas microheterómeros, isómeros de carga o "componentes" (Wood y Moscarello, 1989 (11)), como resultado de un distinto grado de modificaciones post-traduccionales (fosforilación, deamidación, pérdida de la arginina C-terminal, formación de sulfóxido de metionina, etc.). Estos microheterómeros pueden separarse por cromatografía de intercambio iónico. El componente menos catiónico (llamado componente 8) contiene seis residuos de citrulina, procedentes de la desiminación de otros tantos residuos de arginina (Wood y Moscarello, 1989 (11)).

2.1.2.- Fosforilación

Un gran número de estudios han demostrado que la MBP puede ser fosforilada tanto *in vitro* como *in vivo* (Ulmer, 1988 (12), y que cuando se purifica contiene aproximadamente 0.2 moles de fosfato unido a varios residuos de serina y treonina. Se han descrito numerosas kinasas y fosfatasa en mielina, como la kinasa dependiente de AMP cíclico, kinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina, proteína kinasa C, kinasa mediada por gangliósido o la fosfatasa dependiente de ATP y Mg^{2+} (Deber y Reynolds, 1991 (10)). Ello parece indicar que los procesos de fosforilación pueden tener un papel fisiológico significativo dentro del funcionamiento normal de la vaina de mielina. De todas las kinasas capaces de actuar sobre la MBP es la proteína kinasa C la que parece tener mayor implicación en la regulación del estado de fosforilación de esta proteína dentro de la vaina de mielina. Así, parece ser que el proceso puede estar regulado por señales extracelulares que desencadenan la cascada de los polifosfoinosítidos. Ello en último término conduce a la liberación de Ca^{2+} de reservorios internos y la formación de diacilglicerol (DAG), ambos necesarios para la activación de la proteína kinasa C.

El significado fisiológico de la fosforilación de la MBP parece estar relacionado con el grado de compactación de la vaina de mielina. Esta modifica-

ción postraducciona reduce las cargas positivas de la proteína y disminuye la interacción electrostática con fosfolípidos negativos, que se supone que es la fuerza principal que conduce a la compactación dentro de los espacios citoplasmáticos de la vaina y la formación de las líneas densas. Se sabe que las regiones menos compactas dentro de la vaina de mielina son más abundantes en los microheterómeros menos cargados (más fosforilados) de la MBP (Cruz y Moscarello, 1985 (13)), y que el componente 8 (el más fosforilado) es el de menor capacidad de agregación de vesículas lipídicas que contienen fosfolípidos negativos *in vitro*, a diferencia de los componentes menos fosforilados (Wood y Moscarello, 1989 (11)). Se ha demostrado, así mismo, que la propagación repetitiva de potenciales de acción causa una disminución en la estabilidad estructural de la vaina, principalmente en las regiones paranodales (Moran y Mateu, 1983 (14)). Todos éstos resultados parecen indicar que la fosforilación/defosforilación de la MBP puede gobernar el estado de compactación de la vaina en respuesta a estímulos externos, tales como el propio potencial de acción o la unión de algún neurotransmisor a receptores específicos en la membrana mielínica. La propia MBP puede participar en la regulación de su fosforilación estimulando la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositoles recientemente descrita en mielina (Tompkins y Moscarello, 1991 (15)). Así, la MBP no fosforilada estimula *in vitro* de dos a tres veces la actividad de esta enzima, que en último término conduce a la activación de la proteína quinasa C y a su fosforilación. La fosforilación de la MBP reduce el efecto estimulatorio.

2.1.3.- Metilación

El análisis sobre MBP aislada revela que contiene un residuo de arginina (en la posición 107) presente en sus formas mono y dimetiladas. Varios trabajos parecen indicar que esta modificación postraducciona puede representar un paso importante en la formación de la vaina de mielina. Tiene lugar durante los

estadios de formación de la mielinización, y podría constituir una señal de iniciación (Chanderkar et al., 1986 (16)). Las consecuencias de la metilación en la biofísica de la molécula pueden manifestarse como un aumento en la hidrofobicidad de la región en torno a la arginina modificada, y consecuentemente un aumento en las interacciones proteína-proteína (por ejemplo, con los proteolípidos) o proteína-lípidos (Young et al., 1987 (17)). La metilación de la MBP ocurre tanto *in vivo* como *in vitro* catalizada por una proteína metilasa I específica de MBP (Ghosh et al., 1991 (18)).

2.1.4.- Glicosilación

La proteína básica aislada no tiene ningún resto glucídico unido a su molécula, pero sin embargo es un aceptor natural de N-acetilgalactosamina si se incuba en presencia de una galactosil transferasa apropiada y UDP-N-acetilgalactosamina. Los sitios principales de unión son dos restos de treonina, Thr-95 y Thr-98, ambos en la vecindad del triplete de prolina (residuos 99-101), que parece representar una secuencia esencial para la transferencia de la N-acetilgalactosamina. Sin embargo, la función de esta modificación todavía no ha sido descubierta, y todavía se desconoce si el proceso tiene lugar *in vivo*.

2.1.5.- Isoformas

La heterogeneidad de la proteína básica se ve aumentada por el hecho de que, según la especie, la MBP aparece como varias formas moleculares o isoformas, es decir, proteínas de distinto peso molecular, todas procedentes del mismo gen, producto de cortes y empalmes alternativos de los siete exones que forman parte de él (Mikoshiba et al., 1991 (19)). La MBP humana está presente como tres isoformas diferentes, de 21.5, 18.5 y 17.2 kDa. La isoforma de 18.5 kDa es la especie principal expresada en mielina. Las otras dos difieren en un péptido de 26 aminoácidos adicionado al extremo N-terminal (forma de 21.5

kDa) o en la pérdida de un péptido de 11 residuos en el extremo C-terminal (forma de 17.2 kDa). Recientemente, además, se ha detectado una nueva isoforma, de 20.2 KDa en humanos (Kerlero de Rosbo et al., 1991 (20)). En ratón y otros roedores aparece otra isoforma de 14 kDa, ausente en humanos, bastante abundante.

En general las isoformas distintas a la de 18.5 kDa están presentes en menor concentración, y hasta el momento se conoce poco respecto a su papel fisiológico.

2.1.6.- Estructuras secundaria y terciaria

La proteína básica aislada, en solución acuosa, no parece adoptar ningún tipo de estructura secundaria convencional (hélice o estructura β), al menos que se pueda medir con la técnicas tradicionales de determinación de estructura secundaria, tales como dicroísmo circular, dispersión óptica rotatoria o espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Estos resultados no dependen del método de aislamiento de la proteína: son idénticos tanto si la proteína se purifica con solventes orgánicos como si se purifica con soluciones salinas, como por ejemplo cloruro cálcico (Gow y Smith, 1989 (21)). El resultado es bien distinto cuando la estructura secundaria de la proteína se examina en presencia de lípidos, especialmente si éstos contienen algún fosfolípido negativo. En este caso la estructura secundaria de la proteína sufre una alteración drástica, adoptando una conformación altamente ordenada, con predominancia de estructura en lámina β antiparalela (Surewicz et al., 1987 (22)). Ello es consistente con las predicciones de estructura secundaria realizadas por Stoner (Stoner, 1984 (23); Stoner, 1990 (24)), cuyo modelo contempla una lámina β antiparalela integrada por cinco segmentos de la cadena polipeptídica y que, a falta de una confirmación experimental, puede constituir una buena aproximación a la estructura secundaria nativa que adopta la proteína dentro de

la vaina de mielina.

2.1.7.- Actividad encefalitogénica

Se conoce desde hace muchos años que la inoculación de MBP a animales de experimentación induce el desarrollo de una patología desmielinizante, llamada encefalitis alérgica experimental (EAE), cuyas manifestaciones clínicas son muy semejantes a la patología desmielinizante humana más importante, la esclerosis múltiple. La sensibilización del sistema inmune frente a la MBP produce, en último término, la activación de macrófagos que atacan a la vaina de mielina y producen lesiones desmielinizantes dentro del sistema nervioso central.

2.2.- *Proteínas proteolípídicas*

El proteolípido de mielina (PLP) es el componente principal de los complejos lipoproteicos extraíbles con solventes orgánicos a partir del cerebro. Fue descubierto por Folch y Lees (Folch y Lees, 1951 (25)) al extraer los lípidos del cerebro con cloroformo/metanol 2:1 v/v. Constituye el componente proteico principal de la membrana mielínica, donde representa un 50-60% de la proteína total. Se trata de una proteína integral de membrana, con varios dominios hidrofóbicos que atraviesan la bicapa en su totalidad y se extrae del tejido nervioso o de membrana mielínica purificada unido a gran cantidad de lípidos. Esta no es, sin embargo, la causa de sus particulares propiedades de solubilidad, porque la proteína purificada, desprovista de lípidos (apoproteína proteolípídica o PLA) sigue siendo soluble en solventes orgánicos, si bien puede ser convertida a una forma hidrosoluble por varios procedimientos (Lees y Sakura, 1978 (26)).

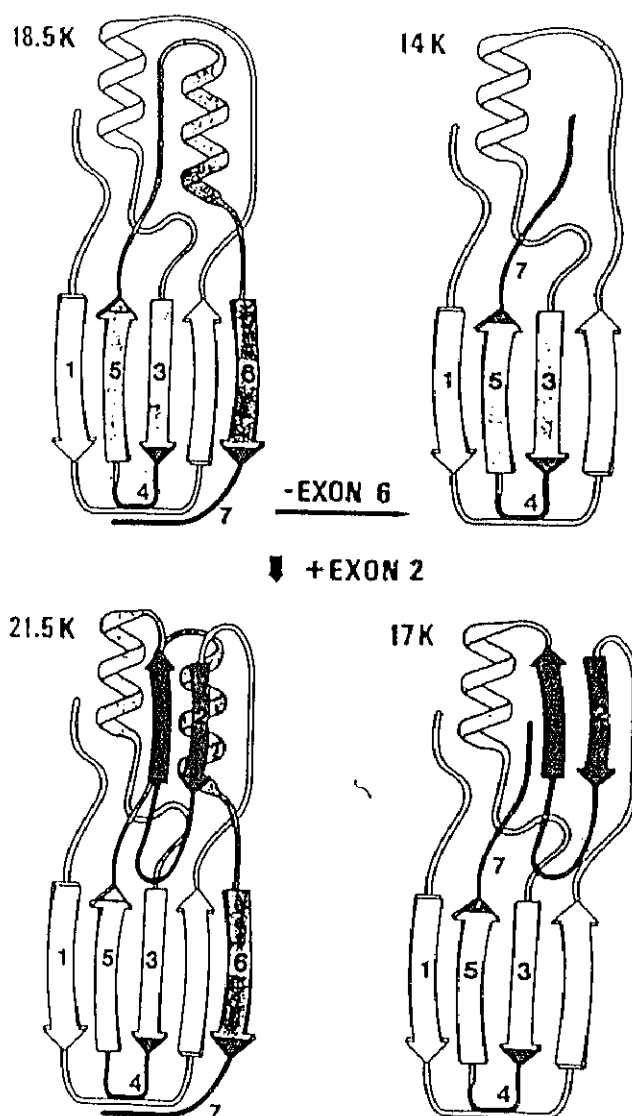


Figura 3.- Predicción de la estructura secundaria de las cuatro isoformas más importantes de la proteína básica de ratón, según el modelo de Stoner (Stoner, 1990 (24)). Los números que figuran dentro de algunos segmentos indican el exón del que proceden.

2.2.1.- Estructura primaria: isoformas

A pesar de que el PLP fue uno de los primeros componentes proteicos de sistema nervioso en ser aislado, transcurrieron unos 30 años desde que se descubrió hasta que se consiguió descifrar en su totalidad su secuencia aminoacídica, principalmente debido a la inexistencia de métodos de separación de los péptidos hidrofóbicos resultantes de su hidrólisis química o enzimática. La secuencia del PLP se ha establecido por los métodos clásicos de la química de proteínas, así como por secuenciación del cDNA del proteolípido de varias especies, como rata, ratón, vaca y humanos. Se trata de una única cadena polipeptídica de 276 aminoácidos y un peso molecular de 29891 Da, con la particularidad de tener unidos covalentemente residuos de ácidos grasos, lo cuál contribuye a elevar aún más la hidrofobicidad de la proteína.

Contiene 4 restos de treonina y 14 restos de cisteína/hemicistina, de los cuáles 10 podrían formar cinco puentes disulfuro (Shaw et al., 1989 (27)). Tiene mayor cantidad de aminoácidos dicarboxílicos que de aminoácidos básicos, pero aproximadamente la mitad de los residuos de ácido aspártico o glutámico están amidados, por lo que el punto isoelectrico de la molécula es básico ($pI = 9.2$). Aproximadamente el 60% de los aminoácidos en la secuencia del PLP son de carácter no polar.

La estructura primaria del PLP está muy conservada a lo largo de la evolución, habiendo muy pocas diferencias entre la proteína humana, la bovina y la de rata. El PLP humano (también llamado lipofilina) y el bovino difieren tan sólo en dos aminoácidos (Stoffel, 1990 (3)). Filogenéticamente, el PLP comienza a expresarse en la mielina de sistema nervioso central de vertebrados con la aparición de los primeros tetrápodos, los anfibios. En los peces está ausente, y en su lugar, aparecen proteínas intrínsecas con inmunorreactividad frente a anticuerpos contra la proteína P_0 , la glicoproteína intrínseca principal de la mielina de sistema nervioso periférico en los vertebrados superiores. Ello

parece indicar que la aparición del PLP en la mielina central se correlaciona con el salto evolutivo que supone la conquista del medio terrestre. A este respecto, es de destacar que en las formas de transición entre los peces teleósteos y los anfibios, tales como los peces pulmonados y los celacantos, ya aparece el PLP como el componente intrínseco principal en la mielina central. En el primero de los casos (peces pulmonados), la molécula del PLP aparece glicosilada (revisado por Waehneldt et al., 1990 (28)).

De manera análoga a lo que sucede con la proteína básica, existen isoformas de la proteína proteolipídica de menor peso molecular, procedentes de distintas modificaciones post-transcripcionales en el mensajero que codifica la molécula del PLP. La principal y más abundante de estas isoformas es el proteolípido denominado DM20, en alusión a su peso molecular aparente deducido a partir de su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida con SDS (migra a un peso molecular aparente de 20 KDa; Agrawal et al., 1972 (29)). La secuencia de DM20 es idéntica a la del PLP excepto en una delección de unos 40 aminoácidos, correspondientes a los residuos 116-150 del PLP. Este segmento es uno de los más polares en la molécula del PLP y, por consiguiente, DM20 es aún más hidrofóbico.

Además del DM20 se han detectado otros proteolípidos de menor peso molecular que también podrían estar codificados por el mismo gen (Schindler et al., 1990 (30)).

2.2.2.- Acilación

La principal modificación post-traduccionaI que experimenta la molécula del PLP y su principal isoforma DM20 es la acilación por ácidos grasos, principalmente palmítico, esteárico y oleico, mediante enlace éster o tioéster en residuos de treonina o cisteína, respectivamente. Uno de estos aminoácidos acilados parece ser la treonina 198, si bien se calcula que existen 2 moles de

ácidos grasos por mol de proteína. Recientemente se ha demostrado que una gran proporción de los ácidos grasos unidos covalentemente al PLP lo hacen mediante enlaces tioéster a residuos de cisteína (Bizzozero y Good, 1990 (31)). En concreto, la cisteína 108 ya ha sido identificada como sitio de acilación (Bizzozero et al., 1990 (32)). La acilación del PLP parece ser un proceso autocatalítico, en el cuál el proteolípido puede actuar simultáneamente como sustrato y como aciltransferasa (Bizzozero et al., 1987 (33)). El papel preciso que juega la esterificación del PLP en la mielina todavía es desconocido, si bien podría estar relacionado con la estabilización de su estructura terciaria. Es de destacar que la secuencia de aminoácidos que rodea a la cisteína 108 es casi idéntica a la de los sitios de acilación encontrados en la rodopsina, receptor acoplado a proteínas G, y como en la propia rodopsina, el receptor β -adrenérgico u otros receptores acoplados a proteínas G, la cisteína acilada en el PLP se localiza dentro de un dominio hidrofílico cargado positivamente (Bizzozero et al., 1990 (32)).

2.2.3.- Estructura secundaria

Varios estudios biofísicos sobre la molécula del PLP, mediante técnicas de dicroísmo circular, dispersión óptica rotatoria y espectroscopías infrarroja y Raman han demostrado que esta proteína tiene flexibilidad conformacional. Esto es, su estructura secundaria se adapta a la polaridad de su entorno. Así, cuando la apoproteína está disuelta en solventes de baja constante dieléctrica, tales como mezclas de cloroformo y metanol, predomina la estructura alfa-helicoidal. La helicidad es muy inferior en solventes acuosos (para la forma hidrosoluble), y aparecen cantidades sustanciales de estructuras β y desordenada. El entorno hidrofóbico que proporcionan los lípidos parece tener un efecto similar al de los solventes orgánicos sobre la conformación de la proteína. Así, el PLP aislado con sus lípidos mantiene una conformación principalmente

helicoidal, mientras que la proteína delipidada y suspendida en medios acuosos dispone de mayor cantidad de estructuras β y desordenada (Carmona et al., 1988 (34)). Así mismo, la estructura mayoritaria de la apoproteína incorporada a liposomas es alfa helicoidal, aunque las estructuras β también están presentes (Surewicz et al., 1987 (35)).

2.2.4.- Disposición del PLP en la membrana

A partir de la secuencia aminoacídica de la proteína proteolipídica se han propuesto varios modelos, en total cinco, sobre la disposición que adopta el PLP en la bicapa miélnica, basados en métodos de predicción de estructura secundaria, perfiles de hidrofobicidad y datos experimentales. Los modelos difieren entre sí, fundamentalmente, en el número de dominios asignados como transmembrana (esto es, dominios hidrofóbicos que atraviesan en su totalidad la bicapa adoptando una estructura alfa-helicoidal) y en la orientación de los dominios hidrofílicos o "lazos" que los conectan entre sí.

Los dos primeros modelos en ser propuestos fueron los de Laursen et al. (1984 (36)) y Stoffel et al. (1984 (37)). Ambos contienen tres dominios hidrofóbicos transmembrana y otros dos "cismembrana" (que entran y salen por el mismo lado de la bicapa). Los dos modelos coinciden, así mismo, en la localización de los extremos N y C terminales, colocando el primero hacia el medio extracelular (el intraperíodo en la vaina de mielina), y el segundo en el fluido citoplasmático (la línea densa). Difieren, principalmente, en la localización del mayor de los dominios hidrofílicos, muy cargado positivamente (residuos 87-153), que es citoplasmático en el modelo de Laursen et al (1984 (36)) y extracelular en el de Stoffel et al. (1984 (37)).

El tercer modelo fue propuesto por Hudson et al. (1989 (38)) como consecuencia de experimentos de inmunocitoquímica realizados sobre cultivos de oligodendrocitos, utilizando anticuerpos dirigidos contra secuencias hidrofíli-

cas o fragmentos de secuencias hidrofóbicas de la molécula del PLP. A diferencia de los dos anteriores, únicamente se reconocen dos dominios hidrofóbicos transmembrana, y la mayor parte de la molécula del PLP queda expuesta hacia el medio extracelular, incluyendo los extremos N y C terminales. De los tres modelos expuestos, éste es el que mejor se adapta a los perfiles de densidad electrónica obtenidos por la técnica de difracción de rayos X aplicada a la mielina de sistema nervioso central (Inouye y Kirschner, 1989 (39)).

Recientemente Popot et al. (1991 (40)) han propuesto dos nuevos modelos, idénticos entre sí pero rotados 180° , que incluyen cuatro dominios transmembrana. Difieren, por tanto, en la exposición de los extremos N y C terminales y de los dominios hidrofílicos. Ambos modelos han sido elaborados por comparación de la secuencia del PLP con la de otras proteínas integrales cuya topología en la membrana es ya conocida. De los dos, el que presenta menor contradicción con los datos experimentales que hasta ahora se conocen es el que expone los extremos N y C terminales hacia el espacio citoplasmático.

Todos los modelos formulados se ajustan mejor o peor a los datos experimentales hasta ahora disponibles, y que son en muchos puntos contradictorios. Estos proceden, fundamentalmente, de estudios bioquímicos (accesibilidad de determinados fragmentos a proteasas, unión de reactivos hidrofóbicos a dominios de la proteína, etc.), biofísicos (difracción de rayos X) e inmunológicos (inmunocitoquímicos). Los modelos de Laursen et al. (1984 (36)) y Stoffel et al. (1984 (37)) son únicos por el hecho de incluir dos dominios "cismembrana", una estructura no descrita previamente para ninguna otra proteína integral. El modelo de Hudson et al. (1989 (38)), si bien se ajusta a datos biofísicos de difracción de rayos X, expone un dominio altamente hidrofóbico al medio extracelular. Los modelos de Popot et al. (1991 (40)) son más clásicos porque se ajustan más a las topologías ya conocidas de otras proteínas integrales de membrana. Hasta el momento no se puede decir a ciencia cierta cuál de los cinco

modelos puede responder mejor a la topología nativa del proteolípido, a falta de datos experimentales concluyentes.

2.2.5.- Funciones del PLP en la mielina

En general, los proteolípidos no mielínicos, definidos operacionalmente como proteínas de membrana que son solubles en solventes orgánicos, están presentes en una amplia variedad de membranas plasmáticas y de orgánulos subcelulares de origen animal, vegetal y de microorganismos, y participan en fenómenos relacionados con el equilibrio iónico a través de membrana o la liberación de neurotransmisores. Varios de ellos aumentan la permeabilidad de la membrana a los iones H^+ (Swain y Boyan, 1988 (41)), Na^+ , K^+ (Torteson y Sapirstein, 1981 (42)) o Ca^{2+} (Knowles et al., 1980 (43)), y otros son capaces de liberar neurotransmisores (acetilcolina) en respuesta a un flujo de Ca^{2+} , como es el caso del denominado mediatóforo, un proteolípido de membranas plasmáticas presinápticas del órgano eléctrico de *Torpedo* (Morel et al., 1991 (44)). Otros proteolípidos están asociados con sistemas de transducción de energía como el de la H^+ -ATPasa, cuya subunidad funcional principal (la F_0) es un proteolípido que actúa como canal específico de protones, y es inhibido por dicitlohexilcarbodiimida (DCCD) (Fillingame, 1980 (45)).

Si bien la definición clásica de proteolípidos es meramente operacional y engloba proteínas de distinta composición aminoacídica, se ha demostrado que el PLP conserva homologías de secuencia con varios otros proteolípidos (Laursen et al., 1983 (46)). En lo referente al PLP, varios estudios *in vitro*, utilizando bicapas lipídicas artificiales y liposomas, han mostrado su participación en fenómenos de translocación iónica para protones y su inhibición por DCCD (Lin y Lees, 1984 (47)) , Na^+ y K^+ (Ting-Beall et al., 1979 (48); Helynck et al., 1983 (49); Cózar et al., 1987 (50)). Todo ello parece indicar que el PLP pueda jugar un papel activo en el mantenimiento del equilibrio iónico

en los compartimentos acuosos dentro de la vaina de mielina. Como se ha visto en el apartado anterior, el PLP es una proteína integral que atraviesa varias veces la membrana, por lo que una buena proporción de la molécula puede interactuar con los lípidos de la bicapa. Con algunos lípidos específicos es capaz de interactuar preferencialmente. Se ha hablado, así mismo, de la flexibilidad conformacional del PLP. Cambios conformacionales en la molécula podrían alterar las interacciones lípido-proteolípido modificando así la fluidez y permeabilidad de la membrana, o la actividad de las enzimas asociadas a mielina (Lees y Macklin, 1988 (51)). Las alteraciones en la conformación proteica pueden resultar de la interacción de la proteína con iones o ligandos tales como los nucleótidos. Es de destacar que en la molécula del PLP se han encontrado homologías estructurales con los dominios que interactúan con nucleótidos en otras proteínas, tales como el dominio catalítico de ATPasas o la superfamilia de las kinasas (Inouye y Kirschner, 1991 (52)).

Aparte de lo hasta ahora descrito, el PLP puede también contribuir a la compactación en el intraperiodo promoviendo la adhesión de las bicapas mediante interacciones hidrofóbicas con los lípidos, y en las líneas densas mediante interacciones lípido-proteína con MBP (Edwards et al., 1989 (53)).

2.2.6. Biología molecular e implicación del PLP en patologías dismielinizantes

El gen del proteolípido de mielina ha sido aislado y caracterizado en el hombre y el ratón (Campagnoni, 1988 (54)). El gen humano para el PLP contiene 7 exones y seis intrones, y una longitud aproximada de 17 kb. Se localiza en el cromosoma X, cerca del locus para la 3-fosfoglicerato kinasa. Mutaciones puntuales en el gen del PLP dan origen a enfermedades caracterizadas por una mielinización deficiente, con distinto grado de severidad, tales como la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher en el hombre, la mutación *jimpy* y su

alelo *jimpy^{msd}* en el ratón, la mutación *md* en la rata o la mutación *shaking pup* en el perro, lo cuál da idea de la importancia que esta proteína tiene en la estructuración normal de la vaina de mielina.

La enfermedad humana de Pelizaeus-Merzbacher se desencadena por un fallo aparente en el mecanismo de diferenciación de los oligodendrocitos, que conduce a un déficit severo de fibras mielinizadas. Se ha demostrado que el defecto molecular reside en una mutación puntual en el gen del PLP: la sustitución de una timidina por una citidina produce el reemplazamiento de un triptofano por una arginina en la posición 162, dentro de uno de los dominios hidrofóbicos de la molécula (Hudson et al., 1989 (55)).

Otras mutaciones puntuales conllevan la sustitución de un aminoácido por una prolina dentro de dominios supuestamente transmembrana, lo cuál provoca distorsiones en la hélice alfa. Tal es el caso de los mutantes *md* ("myelin-deficient") en la rata (Thr74 por Pro), o los mutantes *shaking pup* en el perro (His36 por Pro) (Popot et al., 1991 (40)).

El defecto genético en los ratones *jimpy* radica en una mutación puntual en la señal de corte entre el intrón 4 y el exón 5, que conduce a la eliminación del exón 5 en el mensajero final para el PLP (Macklin et al., 1991 (56)). Ello provoca la eliminación de varios aminoácidos dentro de uno de los dominios hidrofílicos de la molécula, así como una secuencia C terminal aberrante, rica en residuos de prolina y cisteína. En el mutante *jimpy^{msd}* se sustituye la alanina 242 por una valina.

2.2.7.- Encefalitis alérgica experimental y enfermedades humanas desmielinizantes: esclerosis múltiple.

Los primeros trabajos que describen la inducción de encefalitis alérgica experimental (EAE) en animales de experimentación mediante la inyección de PLP se remontan a los años 50, pero la identificación de la proteína básica

como el constituyente encefalitogénico principal de la mielina restó credibilidad a estos trabajos iniciales, porque en un principio no se podía excluir taxativamente la presencia de MBP contaminante en los preparados proteolipídicos inyectados a los animales. Ello pudo ser demostrado claramente en la década de los 80 (Lees y Cambi, 1985 (57)), y desde entonces se ha conseguido inducir EAE en razas de ratones susceptibles (SJL/J) mediante la inyección de líneas de células T específicas para el proteolípido (Satoh et al., 1987 (58)), e incluso clones encefalitogénicos de células T específicos para el PLP (van der Veen et al., 1990 (59)). Se han identificado varios determinantes encefalitogénicos en la molécula capaces de inducir EAE en ratones. Tal es el caso del péptido 139-151, integrado en el dominio hidrofílico principal del PLP (Figura 5), que es un potente encefalitógeno para ratones SJL/J (Sobel et al., 1990 (60)), aunque no tiene actividad en ratones SWR (Sobel et al., 1991 (61)). El péptido 103-116, por el contrario, es encefalitogénico para ratones SWR y no para SJL/J. El péptido 215-232 es encefalitogénico para ratones C3H/He (Endoh et al., 1990 (62)). En conejos, el péptido 91-110 ha sido identificado como determinante encefalitogénico (Linington et al., 1990 (63)). El hecho de que distintas especies, e incluso distintas razas de una misma especie tengan tan diferente susceptibilidad al PLP y a sus determinantes encefalitogénicos ponen de manifiesto la importancia del factor genético en el desarrollo de la enfermedad.

Además de factores genéticos y de autoinmunidad, parece que los virus también están implicados en el desarrollo de la esclerosis múltiple. Se ha sugerido que las homologías de secuencia entre las proteínas de mielina y algunas proteínas virales podrían constituir un mecanismo por el cual las respuestas inmunes frente a ciertos virus desencadenarían respuestas cruzadas que conducirían al desarrollo de la enfermedad. Estas homologías se han encontrado entre ciertos segmentos de la molécula del PLP y varias proteínas virales, y son mayores que las descritas previamente para la proteína básica

(Shaw et al., 1986 (64)). En lesiones activas de esclerosis múltiple pueden verse macrófagos separando lamelas de la vaina de mielina por el intraperiodo (Prineas et al., 1984 (65)). Los dominios del PLP extracelulares podrían ser el blanco de las respuestas humorales o celulares desencadenadas frente a proteínas víricas con homologías de secuencia con esas regiones del proteolípido. Se han detectado también un gran número de homologías con el segmento N terminal del PLP (Lees y Macklin, 1988 (51)).

En el suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con diferentes enfermedades neurológicas se ha detectado inmunoreactividad frente al PLP (Trotter et al., 1983 (66)). Además, en condiciones determinadas, los linfocitos procedentes de algunos pacientes con esclerosis múltiple proliferan tras su estimulación con PLP (Johnson et al., 1986 (67)).

Todos los resultados descritos parecen implicar total o parcialmente a la molécula del PLP en la fisiopatología de la esclerosis múltiple y su modelo en animales, la EAE. Aunque la etiología de esta enfermedad todavía no está clarificada, la respuesta del sistema inmune celular frente a varios antígenos de mielina, entre ellos el PLP es la causa principal de la intensa reacción inflamatoria dentro de la sustancia blanca del sistema nervioso central, localizada principalmente en los espacios perivasculares, y la aparición de placas de desmielinización.

2.3.- *Glicoproteína asociada a mielina*

Un componente proteico incluido en la región de alto peso molecular (fracción Wolfgram) en geles de electroforesis es la glicoproteína asociada a mielina (MAG), con peso molecular aparente de 100 kDa. Se trata de una glicoproteína integral de membrana; alrededor del 30% de su peso son oligosacáridos que contienen fucosa, galactosa, manosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina y sulfato. Se localiza preferentemente en la membrana

periaxonal interna de la vaina de mielina, esto es, en la zona de contacto entre el axón y la vaina. Esta posición es compatible con el papel que se le atribuye en las interacciones oligodendrocito-axón o célula de Schwann-axón que desencadenan el proceso de la mielinización en los sistemas nerviosos central y periférico, respectivamente (Quarles, 1983/1984 (68)). De hecho, la MAG es capaz de promover la unión a los axones *in vitro* (Sadoul et al., 1990 (69)). La mayoría de los estudios inmunohistoquímicos indican que la MAG está ausente en la mielina compacta multilamelar.

Varios trabajos han identificado clones de cDNA para la MAG. Las secuencias aminoacídicas derivadas de estos clones indican que esta molécula posee un único dominio transmembrana que conecta el dominio C-terminal, citoplasmático, con una región N terminal, extracelular, fuertemente glicosilada, compuesta de cinco dominios con homología de secuencia entre sí y con las moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Así, la MAG se incluye como miembro de esta superfamilia (Salzer et al., 1987 (70)), que engloba además a otras moléculas del sistema nervioso que participan en interacciones célula-célula, como la molécula de adhesión celular neural (N-CAM).

Estudios de desarrollo revelan que el peso molecular de la MAG decrece a medida que el sistema nervioso central madura. La causa reside en la existencia de dos isoformas diferentes, una grande (L-MAG, con esqueleto polipeptídico de 72 kDa) y otra de menor peso molecular (S-MAG, de 67 kDa), producto de diferentes cortes y empalmes en el RNA mensajero, concretamente en la porción correspondiente al exón 12 (Fujita et al., 1990 (71)). Como resultado, las dos isoformas se diferencian en su región C-terminal (dominio citoplasmático), pero son idénticas en sus dominios extracelular y transmembrana. La expresión de estos dos diferentes mRNA es regulada durante la mielinogénesis: el mensajero para la L-MAG se induce de forma característica durante el período de mayor

actividad mielinogénica, en tanto que el mRNA para la S-MAG se expresa principalmente en mielina madura (Afar et al., 1990 (72)). En sistema nervioso central, L-MAG persiste en una proporción significativa en el adulto, mientras que en sistema nervioso periférico se expresan bajos niveles durante el desarrollo, y está prácticamente ausente en el adulto (Pedraza et al., 1991 (73)). Tanto en SNC como en SNP, S-MAG es la isoforma predominante en el adulto. Estudios recientes, utilizando un retrovirus recombinante para introducir el cDNA de L-MAG en células de Schwann en cultivo, han demostrado que esta isoforma es la responsable del contacto inicial entre la célula glial y el axón destinado a ser mielinizado (Owens et al., 1990 (74)).

2.4.- *Enzimas y receptores asociados a mielina*

Durante muchos años la membrana mielínica ha sido contemplada únicamente como una membrana inerte, cuya función sería el actuar exclusivamente como aislante de los axones nerviosos. Consecuentemente, el enfoque principal de la investigación bioquímica realizada sobre esta membrana se centró durante mucho tiempo sobre sus componentes estructurales lipídicos y proteicos.

Más recientemente, sin embargo, los resultados obtenidos con nuevos experimentos, y la reinterpretación de experimentos anteriores han conducido al reconocimiento de procesos dinámicos dentro de la vaina de mielina, así como de la importancia de las interacciones neurona-glía en el funcionamiento normal del sistema nervioso. Se ha demostrado que los componentes mielínicos exhiben recambio metabólico, así como el traslado de lípidos o precursores desde el axón hasta la mielina, o numerosas modificaciones posttraduccionales (Lees y Sapirstein, 1983 (75)). En el contexto de estas observaciones, el hallazgo de numerosas actividades enzimáticas y algunos receptores de neurotransmisores asociados a mielina vienen a consolidar la idea de que la mielina no es simplemente una membrana inerte, sino que también puede participar en procesos

metabólicos tales como la biosíntesis de lípidos, la fosforilación y desfosforilación de proteínas, y el mantenimiento del equilibrio iónico en los compartimentos acuosos dentro de la vaina o en el espacio periaxonal.

2.4.1.- Enzimas asociadas a mielina

Hasta el momento son más de treinta las actividades enzimáticas asociadas a mielina, siendo las más representativas las que se muestran en la Tabla 2. Dos de ellas, la CNPasa y una hidrolasa de ésteres de colesterol con un pH óptimo en su actividad de 7.2 reúnen los criterios necesarios para ser consideradas específicas de membrana mielínica y de oligodendrocito: la mayoría de la actividad de estas enzimas presente en cerebro se recupera en la mielina purificada, localizándose exclusivamente o casi exclusivamente en esta membrana, y no en otras biomembranas u orgánulos celulares del cerebro. Además, la actividad de estas enzimas en cerebro aumenta de forma paralela a la cantidad de mielina presente, durante los estadios de mielinogénesis activa, y está severamente disminuida en los cerebros de ratones mutantes con deficiencias en la formación de la vaina de mielina (Suzuki, 1980 (76)). Junto a éstas, aparece un número cada vez mayor de enzimas no específicas de mielina, porque también están presentes en otras biomembranas u orgánulos subcelulares, pero cuya localización en la membrana mielínica purificada ha sido confirmada por criterios bioquímicos o inmunológicos, y algunas de ellas han podido ser aisladas a partir de mielina purificada. En este grupo se incluyen un buen número de enzimas relacionadas con la biosíntesis y degradación de los lípidos de la mielina, un hecho que sugiere la transferencia de sustratos desde el axon hasta la vaina de mielina (Ledeen, 1984 (77)). Otras están relacionadas con la fosforilación/desfosforilación de proteínas de la membrana, especialmente de la proteína básica, y algunas fueron tratadas en apartados anteriores. En esta sección se detallarán algunos aspectos de las enzimas de mayor relevancia para

TABLA 2
Actividades enzimáticas en mielina de sistema nervioso central

Enzima	AER	Referencia
Específicas de mielina		
2'-3'-Nucleótido cíclico-3'- fosfodiesterasa (CNPasa)	3-6	(78)
Hidrolasa de ésteres de coles- terol (pH = 7.2)	10	(78)
Localizadas en mielina o no específicas		
<u>De transporte</u>		
Anhidrasa carbónica	0.5-1.0	(78)
5'-nucleotidasa	2.5	(78)
Na ⁺ , K ⁺ -ATPasa	0.8	(78)
Glutation-S-transferasa (forma Pi)	0.84, 0.36	(79)
<u>De metabolismo lipídico</u>		
Fosfolipasa C específica de fosfa- tildilinositol y estimulada por proteína básica de mielina	-	(15)
Enzima esterificante de coles- terol	~ 2	(78)
UDP-gal: ceramida galactosil- transferasa	~ 1	(78)
Fosfoinosítido y difosfoinosí- tido kinasas	0.16-2.4	(78)
Polifosfoinosítido mono y di- fosfoesterasas	0.7-1.0	(78)

TABLA 2 (Continuación)

Enzima	AER	Referencia
Localizadas en mielina o no específicas		
<u>De metabolismo lipídico</u>		
CDP-colina: 1,2-diacil- <i>sn</i> -glicerolcolina fosfotransferasa	-	(78)
CDP-etanolamina: 1,2-diacil- <i>sn</i> -gliceroleanolamina fosfotransferasa	0.9	(78)
CTP:etanolaminafosfato citidiltransferasa	0.19	(78)
Glicerofosforilcolina fosfocolina fosfodiesterasa	3.2	(80)
Fosfatidato fosfohidrolasa	0.17-0.64	(81)
Colina kinasa	-	(78)
Etanolamina kinasa	-	(82)
Acil-CoA sintetasa	-	(83)
Acil-CoA:lisofosfolípido aciltransferasas	-	(84)
Neuraminidasa	< 1	(78)
Metilumbeliferil lipasa	5	(85)
<u>Proteína kinasas y fosfatasa</u>		
Proteína kinasa C	-	(86)
Proteína kinasa dependiente de AMP cíclico	-	(87)
Proteína kinasa dependiente de Ca++ y estimulada por calmodulina	-	(78)

TABLA 2 (Continuación)

Enzima	AER	Referencia
Localizadas en mielina o no específicas		
<u>Proteína kinasas y fosfatasas</u>		
Proteína básica kinasa dependiente de Mg^{++} y estimulada por Ca^{++}	-	(78)
Proteína kinasa modulada por gangliósidos	-	(88)
Proteína básica fosfatasas	-	(89)
Proteína fosfatasa dependiente de ATP/ Mg^{++}	-	(90)
<u>Adenilato ciclasa</u>	-	(91)
<u>Proteasas</u>		
Calpaína II	~	(113)
Metaloproteinasa	-	(92)
<u>Peptidasas</u>	0.6-0.8	(78)
<u>Esterasa no específica</u>	-	(78)
<u>Metilasa 1 específica de la proteína básica</u>	-	(18)

AER, donde se indique, hace referencia a la actividad específica relativa de la enzima, según consta en las referencias bibliográficas que se citan (actividad específica en mielina/actividad específica en el homogeneizado total de cerebro).

los objetivos planteados en esta tesis doctoral.

a) *2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa).*

La CNPasa fue la primera enzima que se caracterizó inequívocamente como un componente de la membrana mielínica. Representa aproximadamente el 4% de la proteína total de esta membrana en el sistema nervioso central, aunque en sistema nervioso periférico su contenido es muy inferior (Vogel y Thompson, 1988 (93)). La enzima hidroliza nucleótidos cíclicos 2',3' produciendo nucleótidos 2'. Su presencia en mielina purificada y membranas de oligodendrocito se ha caracterizado mediante criterios bioquímicos (Sims y Carnegie, 1978 (94)) e inmunohistoquímicos (Nishizawa et al., 1985 (95)).

La enzima purificada a partir de sistema nervioso central se comporta como un agregado de alto peso molecular (100 KDa) cuando se somete a electroforesis en gel en condiciones no reductoras, pero se resuelve en dos polipéptidos con pesos moleculares aparentes entre 44 y 54 KDa bajo condiciones reductoras, llamados CNP I y CNP II, e incluidos en la denominada fracción Wolfgram de las proteínas de mielina. Ambos polipéptidos poseen actividad CNPásica (Gillespie et al., 1990 (96)). La mayor de las subunidades (CNP II) se fosforila activamente *in vitro* e *in vivo* mediante kinasas dependientes de AMPc y calcio, endógenas de membrana mielínica (Bradbury y Thompson, 1984 (97)).

La mayoría de los estudios bioquímicos e inmunohistoquímicos proporcionan evidencias consistentes de que la CNPasa es una proteína periférica, localizada en las líneas densas principales (espacios citoplasmáticos) de la vaina de mielina, a semejanza de la(s) proteína(s) básica(s), (Vogel y Thompson, 1988 (93)), y como ésta(s), se sintetiza en polisomas libres (Gillespie et al., 1990 (96)).

A pesar de ser una proteína caracterizada con bastante detalle desde el

punto de vista molecular, su función precisa dentro de la vaina de mielina todavía no ha podido ser clarificada. La CNPasa ha sido implicada en el metabolismo de las proteínas de mielina (Starich y Dreiling, 1980 (98)). Se ha sugerido también que podría funcionar como una RNA ligasa (Sprinkle et al., 1987 (99)), porque las RNA ligasas eucarióticas tienen tres actividades enzimáticas asociadas, una de las cuáles es la actividad 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterásica. Sin embargo, el significado de esta posible función es bastante incierto, porque en mielina existe muy poco RNA.

El hecho de que en el sistema nervioso central la CNPasa sea uno de los primeros marcadores de oligodendrocito en ser expresados, junto a evidencias que muestran la localización de la CNPasa en posibles áreas de crecimiento de las membranas de oligodendrocito en cultivo, parecen apuntar hacia una participación activa en los primeros estadios de la diferenciación de las células gliales. Además, la CNPasa está enriquecida en aquellas subfracciones de mielina de mayor densidad, que parecen representar un estadio de transición entre la membrana del oligodendrocito y la mielina madura multilamelar. Se ha demostrado, así mismo, la asociación de la CNPasa con la matriz citoesquelética de la vaina de mielina de sistema nervioso central (Pereyra et al., 1988 (100); Gillespie et al., 1989 (101)).

Un hallazgo reciente (Braun et al., 1991 (102)) ha demostrado que la CNPasa es susceptible de sufrir isoprenilación, una modificación posttraduccional restringida a una pequeña familia de proteínas entre las que se encuentran las oncoproteínas *ras* y algunas proteínas G. Esta modificación podría ser la responsable de la extraordinaria avidez que muestra la enzima para unirse a las biomembranas, a pesar de no tener reconocido ningún dominio transmembrana u otros dominios altamente hidrofóbicos. La mayoría de las proteínas citadas, susceptibles de isoprenilación, están relacionadas con algunos aspectos de la transducción de señales extracelulares o de mecanismos regulatorios que

influyen el crecimiento celular y la diferenciación, y aunque aún no se puede asegurar que la CNPasa pertenezca a esta categoría, esta posibilidad no puede excluirse.

b) Hidrolasa de ésteres de colesterol (pH = 7.2)

Junto a la CNPasa, es la otra enzima presente en mielina que reúne los criterios necesarios para ser considerada como específica de mielina. Su pH óptimo es de 7.2, a diferencia de las demás hidrolasas de ésteres de colesterol presentes en cerebro, y es activada por taurocolato y parcialmente inhibida por Triton X-100. Tiene un peso molecular de aproximadamente 30 KDa, y su actividad específica relativa (mielina/homogeneizado de cerebro) es la más alta de todas las enzimas de mielina, cifrada en torno a 10. Tras su solubilización y parcial purificación, su pH óptimo cambia desde 7.2 hasta 6.7-6.8, y requiere la adición de fosfatidilserina para la actividad óptima (Eto y Suzuki, 1973 (103); Igarashi y Suzuki, 1977 (104)). Sus funciones en la vaina no están aún definidas, porque en la mielina de cerebro normal no existen ésteres de colesterol, si bien pueden aparecer con el desarrollo de ciertas patologías.

c) Anhidrasa carbónica

Se ha demostrado por estudios bioquímicos e inmunocitoquímicos la asociación de la anhidrasa carbónica con la membrana del oligodendrocito y con la mielina (revisado por Cammer, 1991 (105)). Su actividad en oligodendrocitos es muy superior a la encontrada en neuronas o astrocitos. La enzima ha sido purificada a partir de mielina aislada. Tiene un peso molecular de 30 KDa y es estimulada por agentes reductores de puentes disulfuro (Sapirstein y Lees, 1978 (106)). Su inhibición por acetazolamida a concentraciones de 10^{-9} - 10^{-8} M sugiere que la isoenzima presente en mielina es la II, hecho confirmado con métodos inmunoquímicos.

Sus posibles funciones dentro de la vaina de mielina pueden estar relacionadas con la regulación del pH dentro de los compartimentos acuosos dentro de la vaina, participando así en mecanismos de transporte iónico y en los movimientos de fluido a través de la membrana (Lees y Sapirstein, 1983 (75)) y/o con la producción de bicarbonato, sustrato de algunas enzimas que participan en la biosíntesis de ácidos grasos y pirimidinas (Cammer, 1991 (105)).

d) *5'-nucleotidasa*

Su presencia en mielina fue sugerida previamente por métodos histoquímicos (Naidoo, 1962 (107)), y confirmada bioquímicamente en mielina asilada de cerebro de rata (Cammer et al., 1980 (108)). El hecho de ser inhibible por concanavalina A sugiere que la enzima de mielina es una glicoproteína. Trabajos posteriores han confirmado la presencia de la enzima en la mielina de cerebro bovino (Casadó et al., 1988 (109)).

La alta actividad específica relativa (mielina/homogeneizado de cerebro) de la 5'-nucleotidasa (alrededor de 2.5) es de especial relevancia, en vista de la potente función neuromoduladora de uno de sus productos de reacción, la adenosina. Esta es más permeable a la membrana que el sustrato, el 5'-AMP, por lo que la enzima podría funcionar para facilitar el transporte de adenosina a través de las bicapas. Su implicación fisiológica en el funcionamiento de la vaina parece más clara tras el descubrimiento de receptores A_1 de adenosina en mielina purificada (Casadó et al., 1991 (110)).

e) *Na⁺,K⁺-ATPasa*

En un principio considerada como marcador de contaminación procedente de otras fracciones de membrana, la asociación de la Na⁺,K⁺-ATPasa con la mielina de sistema nervioso central fue aceptada, aunque no inequívocamente, tras el trabajo de Reiss et al., 1981 (111). Posteriormente se ha comprobado que

la actividad de la enzima de mielina puede ser modulada por el grado de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos unidos a los fosfolípidos (Shantharam y SrinivasaRao, 1989 (112)). Existen estudios citoquímicos e inmunoquímicos que localizan a esta enzima en la lamela más externa de la vaina de mielina.

El papel trascendental que desempeña esta enzima en el movimiento de iones a través de las membranas pone de manifiesto la importancia que pueden tener estos procesos en el funcionamiento correcto de la vaina de mielina.

f) *Calpaína II*

La proteasa neutra activada por concentraciones milimolares de calcio (calpaína II) fue purificada y caracterizada recientemente a partir de mielina de cerebro bovino (Yanagisawa et al., 1988 (113)). Previamente se había sugerido que la membrana mielínica contenía una proteasa neutra endógena, capaz de degradar a la proteína básica y a la glicoproteína asociada a mielina. La degradación de las proteínas de mielina no es inhibible por EGTA a menos que la mielina se solubilice previamente con detergente (Sato et al., 1984a (114)), lo cual sugería que la proteasa debería estar unida a algún sitio hidrofóbico de la membrana mielínica, y que su activación sería dependiente de los iones calcio endógenos de la vaina.

Las calpaínas han sido ampliamente estudiadas en los últimos años a causa de sus peculiares características, tales como la proteólisis limitada de proteínas unidas a membrana o proteínas citoesqueléticas. En el caso de la calpaína asociada a mielina, su presencia adquiere mayor relevancia si se considera que su actividad frente a la proteína básica y la MAG parece estar aumentada en pacientes aquejados de esclerosis múltiple (Sato et al., 1984b (115)). Su actividad está regulada por los lípidos de la mielina; se estimula fuertemente con los lípidos acídicos, especialmente fosfatidilinositol (PI) y

fosfatidilserina (Chakrabarti et al., 1990 (116)).

Su función en la vaina de mielina parece estar relacionada con el metabolismo de las proteínas de mielina, cuya alteración podría conducir al desarrollo de una patología desmielinizante (Chakrabarti et al., 1989 (117)).

2.4.2.- Receptores detectados en mielina

La presencia en mielina de altas cantidades de polifosfoinosítidos, así como de las enzimas de su metabolismo sugería que, al igual que ocurre en otras biomembranas, el recambio de estos lípidos pudiera estar mediado por la estimulación de receptores específicos. La presencia de receptores muscarínicos de alta afinidad, de los subtipos M_1 y M_2 en mielina, y la estimulación de la hidrólisis de los fosfoinosítidos de mielina por agonistas muscarínicos (carbacol), ha sido demostrada recientemente (Larocca et al., 1987 (118)). Un paso clave de este fenómeno es la formación de dos segundos mensajeros, el IP_3 y el diacilglicerol, mediante la hidrólisis del PIP_2 catalizada por la fosfolipasa C. Un posible efecto del diacilglicerol sería la activación de la proteína kinasa C presente en mielina (Tabla 2), cuyo sustrato es la proteína básica. La liberación de Ca^{++} vía IP_3 en mielina, hasta el momento, no parece clara. Los agonistas muscarínicos, como es carbacol, activan la fosfolipasa C y la hidrólisis de fosfoinosítidos, por una parte, e inhiben la actividad de adenilato ciclasa, por la otra. El primero de los efectos parece estar mediado por los receptores M_1 , mientras que en la inhibición de la adenilato ciclasa participaría el subtipo M_2 . En la activación de la fosfolipasa C mediada por receptores M_1 parecen participar proteínas G, detectadas en mielina aislada, solubilizadas y parcialmente purificadas. Han sido identificadas tentativamente como G_p (son ADP-ribosiladas por toxina *pertussis*) y G_s (ADP-ribosiladas por toxina colérica) (revisado por Larocca et al., 1990 (91)).

Como se ha comentado en un apartado anterior, recientemente se ha descrito la presencia en mielina de sistema nervioso central de receptores A_1 de

adenosina (Casadó et al., 1991 (110)). El agonista (R)-fenilisopropiladenosina (R-PIA) es capaz de modificar la microviscosidad, produciendo una fluidificación de la membrana.

2.5.- *Otras proteínas minoritarias de mielina*

2.5.1.- Plasmolipina

La plasmolipina es un proteolípido no relacionado estructuralmente con los proteolípidos clásicos de mielina (PLP y DM20), que fue inicialmente aislado y caracterizado en membranas plasmáticas de riñón. Contiene dos subunidades similares de 14-18 KDa. Tras la adición de ambas subunidades a bicapas lipídicas son observables cambios en la conductancia de la membrana, por la formación de canales específicos de cationes, selectivos de K⁺ y dependientes del voltaje (Torteson y Sapirstein, 1981 (42)). Recientemente, se ha demostrado que este proteolípido está también presente en mielina de sistema nervioso central (Cochary et al., 1990 (119)), donde prodría representar entre un 2.2-4.8% de la proteína total. Es expresada por oligodendrocitos, pero no por astrocitos (Fischer et al., 1991 (120)), y desde el punto de vista filogenético, a diferencia de las otras proteínas principales de mielina, parece restringirse al sistema nervioso de mamíferos (Sapirstein et al., 1991 (121)), lo cuál podría reflejar una función fisiológica específica, característica de la mielina de mamíferos. La capacidad de la plasmolipina para formar canales de K⁺ sugiere que su función puede estar relacionada con la regulación de la excitabilidad de la membrana, y sería consistente con el descubrimiento de canales de K⁺ en la membrana de oligodendrocito (Barres et al., 1988 (122)).

2.5.2.- MOSP (Myelin/Oligodendrocyte-Specific Protein)

Recientemente se ha descrito una nueva proteína de membrana de

superficie, identificada con un anticuerpo monoclonal, expresada exclusivamente en mielina de sistema nervioso central y oligodendrocitos de vertebrados superiores (Dyer et al., 1991 (123)). Tiene un peso molecular de 48 KDa y un punto isoeléctrico de 6.7, e interactúa con los microtúbulos citoplásmicos en el oligodendrocito. Esta proteína podría jugar un papel importante en las interacciones membrana-citoesqueleto durante la formación y el mantenimiento de la mielina de sistema nervioso central.

2.5.3.- ~~MOG (Myelin-Oligodendrocyte-associated Glycoprotein)~~

Se trata de una glicoproteína minoritaria, diferente de la glicoproteína principal de mielina (MAG), que fue inicialmente identificada con un anticuerpo monoclonal (Linington et al., 1984 (124)). Se trata de una proteína con peso molecular de 51-54 KDa, dependiendo de las especies, expresada durante los estadios tardíos del desarrollo, bastante después del inicio de la mielinización. La alta capacidad desmielinizante inducida por sueros anti-MOG ha puesto en evidencia la importancia que puede tener esta proteína en el mantenimiento de la estructura de la vaina (Schluesener et al., 1987 (125)).

2.5.4.- ~~BT57.5~~

Otra proteína minoritaria, con peso molecular de 57.5 KDa, detectada con un anticuerpo monoclonal derivado de ratones inmunizados con mielina de rata parcialmente delipidada (Miller et al., 1989 (126)). Representa menos del 1% de la proteína total de la membrana.

2.5.5.- ~~Lectina Soluble Cerebelar (CSL)~~

Se trata de una lectina con especificidad hacia los glicanos de las glicoproteínas ricos en manosa, que podría desempeñar una importante función

en la estabilización y la formación de la vaina de mielina, sirviendo como puente molecular entre las glicoproteínas de superficie de las células formadoras de mielina, tanto oligodendrocitos como células de Schwann (revisado por Zanetta et al., 1991 (127)). Entre los ligandos encontrados para esta lectina figura la MAG, tanto en sistema nervioso central como en sistema nervioso periférico.

La CSL está presente no sólo en las células mielinizantes, sino también en la mielina compacta, y anticuerpos contra ella están presentes en la mayoría de los pacientes aquejados de esclerosis múltiple.

2.5.6.- Tubulina

La presencia de tubulina asociada a la mielina purificada fue demostrada por criterios bioquímicos e inmunológicos (Reig et al., 1982 (128)). Está integrada en la fracción Wolfgram, y podría desempeñar un papel importante en el proceso de mielinización.

ORIGEN Y ESTRUCTURA DE LA VAINA DE MIELINA DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Aunque muy parecidas desde el punto de vista morfológico, las vainas de mielina de los sistemas nerviosos central y periférico muestran profundas diferencias desde los puntos de vista bioquímico y ontogenético. Filogenéticamente, la mielina del SNP aparece antes que la central, siendo ya detectada en anélidos y crustáceos. Por el contrario, la mielina del sistema nervioso central se asocia comunmente con los vertebrados. Son sintetizadas por diferentes tipos celulares: el oligodendrocito, que origina la mielina de SNC tiene su origen embriológico en el tubo neural, mientras que la célula de Schwann, formadora de la mielina de SNP, deriva de las células de la cresta neural. Ambos tipos de mielina tienen una característica común en su composición bioquímica: la alta relación lípido/proteína. Sin embargo, cada una conserva una composición proteica diferente.

Hay un hecho característico que de por sí establece una profunda diferencia en el proceso de mielinización en los sistemas nerviosos central y periférico: mientras que una célula de Schwann es capaz de formar un único internodo, un oligodendrocito puede emitir 20-50 procesos citoplasmáticos y, por tanto, formar 20-50 internodos. Además, en SNP, algunos axones, generalmente de pequeño calibre (fibras de Remak) están abrazados por células de Schwann y rodeados por su citoplasma, pero éstas no son capaces de formar mielina. Es decir, con raras excepciones, las células de Schwann abrazan a todas las fibras nerviosas en el SNP, pero sólo algunas son capaces de producir una vaina de mielina a su alrededor, mientras que otros axones permanecen no mielinizados, aunque abrazados por un proceso citoplásmico de la célula de Schwann.

En cualquier caso, y siempre en SNP, es un requisito indispensable para la génesis de la vaina de mielina que las células de Schwann secreten una lámina basal cubriendo el conjunto célula de Schwann-futuro internodo (Bunge et al.,

1986 (129)).

En esta sección se describirá el proceso de la mielinogénesis y la morfología de la vaina de mielina de SNC.

1.- El oligodendrocito

La primera descripción del oligodendrocito fue dada por Robertson en 1899 (130), el cual observó, utilizando técnicas de impregnación metálica sobre preparaciones de SNC, pequeñas células ramificadas de aspecto característico en el córtex y en la sustancia blanca. Sin embargo, fue el histólogo español Pío del Río Hortega quien describió y dio su nombre definitivo a este tipo celular, en referencia a sus escasas ramificaciones (procesos) en comparación con otro tipo de célula neuroglial por entonces conocido, el astrocito (Del Río Ortega, 1921 (131); Del Río Ortega, 1928 (132)). Posteriormente se comprobó que los oligodendrocitos podían observarse únicamente en aquellas regiones del SNC que contenían mielina.

Fue el propio del Río Hortega quien clasificó a los oligodendrocitos desde dos perspectivas diferentes:

a) Atendiendo a su posición: **perineuronales** (si su cuerpo celular es adyacente al soma neuronal) o **interfasciculares** (si están interpuestos entre fibras nerviosas mielinizadas en la sustancia blanca).

b) Atendiendo al tipo y número de ramificaciones de los procesos: **tipo I** (soma pequeño con procesos frecuentes, largos y muy finos); **tipo II** (soma mayor, con menos procesos primarios que son de mayor diámetro), **tipo III** y **tipo IV** (más alargados y con sólo uno o dos procesos).

La clasificación de del Río Hortega ha sido posteriormente confirmada por microscopía electrónica, y aún hoy tiene validez.

El oligodendrocito procede de una célula progenitora glial bipotencial, denominada O-2A, capaz de diferenciarse en dos tipos celulares distintos: los

oligodendrocitos y los astrocitos tipo 2. Son éstos un tipo particular de astrocitos, caracterizados por sus prolongaciones multipolares y una morfología de tipo más bien oligodendroglial, primero detectados en sistemas *in vitro*, aunque evidencias recientes parecen confirmar su existencia *in vivo* (Lubetzki y Zalc, 1990 (133)). La diferenciación de la célula O-2A en uno u otro sentido depende de un factor exógeno, como ha podido demostrarse utilizando cultivos de células disociadas de nervio óptico de rata neonata (Raff et al., 1983 (134)). Así, si la célula O-2A se cultiva en un medio que contiene 10% de suero fetal bovino la mayoría de las células se diferencian en astrocitos tipo 2. Si se cultivan en un medio que contiene menos de 1% de suero fetal bovino, la mayor parte se diferencian en oligodendrocitos, lo cuál parece sugerir que es ésta una propiedad constitutiva de la célula O-2A en ausencia de señal extracelular. La diferenciación tiene lugar *in vitro* en dos o tres días, al tiempo que se paran las divisiones celulares. Esta diferenciación precoz, sin embargo, no es observada *in vivo*: las células O-2A continúan proliferando durante varias semanas después del nacimiento produciendo oligodendrocitos y, probablemente, astrocitos tipo 2, lo cuál parece indicar la existencia *in vivo* de un factor que se opone a la diferenciación precoz de las células O-2A. Varios trabajos han mostrado la estimulación de varios factores de crecimiento sobre la proliferación de las células O-2A en cultivo, impidiendo a la vez su diferenciación prematura en oligodendrocitos. Entre estos factores destacan el PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) (Richardson et al., 1988 (135)), que es segregado por los astrocitos tipo 1 en cultivo; el IGF (*Insulin-like Growth Factor*), que también parece ser segregado por astrocitos tipo 1 (Lubetzki y Zalc, 1990 (133)), y el FGF (*Fibroblast Growth Factor*) (McKinnon et al., 1989 (136)).

La importancia que tiene la presencia de los astrocitos tipo 1 para que la mielinización mediada por oligodendrocitos se lleve a cabo ha sido recientemente puesta en evidencia *in vivo* en médula espinal de rata adulta (Franklin et al.,

1991 (137)).

Estudios recientes han sugerido que los procesos emitidos por los astrocitos de tipo 2 se asocian estrechamente a los nodos de Ranvier, por lo que podrían jugar algún papel en el mantenimiento de la vaina de mielina. Si ello se llega a confirmar, la célula O-2A daría nacimiento a dos tipos celulares distintos, ambos implicados en el proceso de mielinización (Raff, 1989 (138)).

Contrariamente al caso de los oligodendrocitos, parece que la diferenciación de las células O-2A en astrocitos tipo 2 requiere una señal extracelular que, como se ha comentado antes, estaría contenida en el suero fetal bovino. La diferenciación astrocitaria no sería una propiedad intrínseca de la célula O-2A. Uno de los posibles candidatos como factor de diferenciación astrocitaria es el CNTF (*Ciliary Neurotrophic Growth Factor*), aunque varios otros factores también pudieran estar implicados.

El papel que las neuronas o ciertos factores neuronales ejercen sobre la diferenciación glial es controvertido, aunque algunos trabajos como el de Levine (1989 (139)) parecen indicar que algún factor contenido en el medio condicionado de interneuronas cerebelares en cultivo es capaz de retardar la diferenciación de los progenitores gliales en oligodendrocitos.

En resumen, los conocimientos que hasta ahora se poseen indican que la diferenciación de los oligodendrocitos es el resultado de interacciones moleculares entre los distintos tipos de células gliales y, quizás, neuronales.

2.- Maduración de los oligodendrocitos

Un oligodendrocito es considerado maduro, capaz de formar mielina, cuando ha sintetizado en su cuerpo celular todas las moléculas constitutivas de esta membrana, tanto específicas (galactocerebrósido, CNPasa, PLP, MBP, MAG) como no específicas (colesterol, fosfolípidos, etc.). De todos estos constituyentes, el más precoz en ser sintetizado es el galactocerebrósido (GalC),

por lo que la diferenciación del oligodendrocito ha sido considerada como contemporánea a la expresión del GalC. Esta es precedida por la expresión del marcador antigénico O4, y en este estadio la diferenciación hacia la vía oligodendroglial no está definitivamente fijada: la célula precursora aún puede ser inducida hacia un fenotipo astrocitario. Incluso cuando la expresión de GalC ha tenido lugar, se ha demostrado *in vitro* que una variación brusca en las condiciones de cultivo, por ejemplo suplementar el medio con un 10% de suero fetal bovino, hace aparecer células con fenotipo mixto oligodendroglial y astrogial, expresando a la vez GalC y GFAP (Proteína acídica fibrilar de glía, marcador de astrocitos). Estos datos sugieren que la expresión de GalC es uno de los fenómenos más iniciales en la diferenciación de la célula O-2A.

Estudios *in vitro* (Dubois-Dalcq *et al.*, 1986 (140)) e *in vivo* (Monge *et al.*, 1986 (141)) han puntualizado ciertos detalles en la maduración del oligodendrocito, que pueden resumirse como sigue:

- a) No responde a un mecanismo del todo o nada.
- b) Parece ser un proceso discontinuo en el tiempo. GalC y CNPasa son marcadores precoces, precediendo la expresión del GalC en 24 horas a la expresión de la CNPasa. Tras un período de cinco días aparecen los marcadores tardíos, cronológicamente: MBP, PLP y MAG. Veinticuatro horas más tarde aparecen las primeras vainas de mielina.

La secuencia de expresión de todos estos componentes en el oligodendrocito no necesariamente se corresponde con su secuencia de deposición en la vaina de mielina. Por ejemplo, la MAG, que es el último componente en ser sintetizado, es el primero en ser depositado en la vaina de mielina. Es éste un hecho significativo, porque a la MAG se le atribuyen las funciones de reconocimiento de axones por los procesos oligodendrogiales en los primeros estadios de la mielinogénesis (Owens y Bunge, 1989 (142)).

Todos los datos hasta ahora presentados, obtenidos fundamentalmente

siguiendo la expresión de marcadores antigénicos mediante técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas, han sido confirmados a grandes rasgos con técnicas de biología molecular (hibridación *in situ* y *Northern Blot*) para detectar la aparición de los ARN mensajeros correspondientes, si bien se han detectado algunas diferencias puntuales, en particular en lo concerniente al PLP. Así, se ha confirmado que el mensajero del PLP precede en más de una semana a la aparición de la proteína.

3.- La mielinogénesis en el SNC

Es sabido que en rata y ratón la mielinización, que sigue a la maduración de los oligodendrocitos, comienza alrededor del séptimo día tras el nacimiento, siendo muy intensa entre los días 12 y 20, y máxima alrededor de los días 18-21 postnatal, completándose alrededor del día 30. En humanos, por el contrario, la mielinogénesis tiene su inicio hacia el sexto mes de embarazo, completándose entre dos y cuatro años postparto (Stoffel, 1990 (3)). En términos generales, la mielinización sigue el orden del desarrollo filogenético; según va madurando el sistema nervioso, primero mieliniza el SNP, luego la médula espinal, y por último el cerebro. Incluso dentro del cerebro, áreas diferentes mielinizan en distintos estadios, siendo las áreas de asociación intracorticales las últimas en hacerlo (Morell *et al.*, 1989 (4)). La mielinización, pues, sigue un gradiente caudo-rostral.

En el período de mielinización intensa, el oligodendrocito es capaz de sintetizar más de 50 veces su propio peso en membrana. En rata y ratón, la cuantificación de los ARN mensajeros codificantes para las tres proteínas mayoritarias de mielina (MBP, PLP y CNPasa) muestra un perfil de evolución trifásica: un primer período, entre el día de aparición del mensajero y los días 7-11 postparto con un aumento lento en la tasa de ARNm; un segundo período, entre los días 7-11 y el día 30 postnatal en el que hay un aumento brusco e

importante en la tasa del mensajero, seguido de un decrecimiento rápido, y un último período, alrededor del día 30, caracterizado por la estabilización de la tasa del mensajero. El primer período corresponde a una fase de desarrollo durante el cual un número creciente de células progenitoras se diferencian en oligodendrocitos. El último período corresponde al equilibrio necesario para el mantenimiento, en la edad adulta, de una tasa constante de proteínas. El segundo período corresponde al de mayor actividad de mielinización, durante el cual los oligodendrocitos mantienen una enorme actividad sintética. Se ha demostrado que el aumento brusco en la tasa de ARNm se corresponde realmente con un aumento en la transcripción, y no en la estabilidad de los mensajeros, sugiriendo la existencia de algún amplificador de la transcripción (*enhancer*). El hecho de que la tasa de mensajeros para MBP y PLP aumenten cuando los oligodendrocitos se cultivan con neuronas (Macklin *et al.*, 1986 (143)) sugiere que la señal de amplificación podría ser de origen neuronal.

Trabajos recientes llevados a cabo sobre células de Schwann (Monuki *et al.*, 1989 (144)) han desvelado la existencia de señales intracelulares de mielinización. La célula de Schwann en cultivo, a diferencia del oligodendrocito, cesa rápidamente de expresar sus marcadores mielínicos. El aumento de la tasa de AMP cíclico en las células de Schwann induce la reexpresión de estos marcadores e induce la transcripción de un gen denominado SCIP (*Suppressor-Cyclic AMP-Inducer-Protein*). La tasa del mensajero del gen SCIP alcanza su máximo 12 horas después de la puesta en contacto de las células de Schwann con el AMPc, y es entonces cuando sobreviene la inducción de la transcripción de los genes de la mielinización. Pese a que estos resultados se han obtenido en células de Schwann, la expresión del gen SCIP no está restringida al SNP, sino que es igualmente expresado en el SNC.

Los resultados expuestos pueden ayudar a componer la cascada de eventos que conducen a la mielinización: el contacto entre axones y células mielinizantes

induciría una elevación en la tasa de AMPc. Este segundo mensajero levantaría la supresión ejercida sobre el gen regulador SCIP, cuya expresión activaría la expresión de los genes mielínicos que inducirían la mielinización.

4.- **Formación y estructura de la vaina de mielina**

La mielinización en el SNC comienza cuando los axones destinados a ser mielinizados adquieren un diámetro aproximado de 1 μm . En este punto, los oligodendrocitos elaboran extensiones o procesos a partir de su membrana plasmática que abrazan a los axones formando estructuras en forma de cáliz. Posteriormente, la extensión del proceso celular provoca que uno de los "labios" del cáliz, el que será la lengüeta interna de la vaina madura, se introduzca por debajo del otro (la lengüeta externa). El desarrollo de la vaina de mielina se produce por la rotación subsecuente de esta lengüeta interna alrededor del axon. Casi inmediatamente después de este fenómeno acontece la compactación de la vaina, esto es, la aposición de la cara citoplasmática de una bicapa con la vecina y exclusión de citoplasma que las separa, y la aposición de las caras extracelulares.

Las aposiciones citoplasmáticas dan lugar a las denominadas **líneas densas** cuando cortes de la vaina de mielina se observan al microscopio electrónico, debido a su gran densidad electrónica. Análogamente, las aposiciones extracelulares originan las **líneas intraperiódicas**, que aparecen al microscopio electrónico como una línea doble de menor densidad que la línea densa.

El proceso de compactación origina una estructura en multicapa caracterizada por la repetición de la unidad membrana-espacio citoplasmático-membrana-espacio extracelular-membrana. Esta disposición espiral altamente ordenada de membrana y compartimentos acuosos puede alcanzar, dependiendo de la especie, un apreciable grosor, entre 5 y 20 multicapas (Deber y Reynolds, 1991 (10)).

Según avanza el proceso de formación de la vaina de mielina, la conexión

entre el cuerpo celular del oligodendrocito y las membranas compactantes se va atenuando gradualmente, hasta tal punto de que en la mielina madura esta unión es muy difícil de visualizar por microscopía electrónica.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

Las evidencias recogidas en la introducción indican que definitivamente hay que desterrar el tradicional concepto que consideraba a la mielina como una membrana inerte, y sustituirlo por el de una membrana capaz de experimentar procesos dinámicos en lo referente al metabolismo de sus propios componentes, a la regulación de los niveles iónicos en los compartimentos de la vaina y/o del espacio periaxonal y a la respuesta frente a señales externas. Significativamente, éste concepto podría ser también extrapolable a los dos componentes proteicos principales de esta membrana, las proteínas básicas y los proteolípidos, durante mucho tiempo considerados como proteínas meramente estructurales. Particularmente en el caso de los proteolípidos, por su gran abundancia y su probable implicación en el desarrollo de patologías desmielinizantes, el conocimiento de su papel funcional dentro de la vaina es especialmente importante.

Para investigar este aspecto, los sistemas reconstituidos de membrana han sido especialmente útiles con otras proteínas funcionalmente activas, permitiendo su caracterización detallada y los requerimientos básicos para su actividad. Este abordaje experimental requiere, por una parte, el aislamiento sin pérdida de actividad de la proteína a partir de la membrana, y por otro, la elección de un entorno lipídico adecuado para su reconstitución. Con respecto a éste último aspecto, los ensayos de reconstitución llevados a cabo con el proteolípido de mielina han utilizado lípidos muy poco relacionados con el entorno lipídico nativo en que está embebida esta proteína en la mielina, a pesar de la importancia que tienen las interacciones con lípidos específicos para la actividad de gran número de proteínas funcionalmente activas.

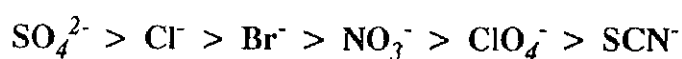
El aislamiento y purificación de las proteínas de membrana conlleva grandes problemas metodológicos, siendo el mayor obstáculo el de identificar aquellos procesos capaces de disgregar la matriz lipídica de la bicapa y disociar

las proteínas sin producir desnaturalización. Como muchas de estas proteínas son componentes integrales de la membrana, como es el caso de los proteolípidos, los procesos que tienen como fin aislarlos y purificarlos tienden a ser laboriosos y, en algunos casos, pueden conducir a pérdidas de actividad biológica. Una vez aisladas, la naturaleza altamente hidrofóbica de estas proteínas continúan obstaculizando su posterior purificación y caracterización.

En general, el aislamiento de proteínas intrínsecas de membrana ha sido llevado a cabo mediante el uso de detergentes, agentes caotrópicos o solventes orgánicos. Cada uno de ellos tiene sus propias ventajas e inconvenientes. Los detergentes han sido y son ampliamente utilizados en la solubilización y purificación de proteínas intrínsecas (Tandford y Reynolds, 1976 (145)). Sin embargo, algunos de ellos pueden inhibir la actividad proteica, pueden interferir con procesos posteriores de purificación o análisis y generalmente son difíciles de eliminar. Por este motivo, los detergentes de elección son los no iónicos, utilizados con éxito en la purificación y reconstitución de muchas proteínas intrínsecas sin pérdida sustancial de actividad, que además no interfieren con métodos de purificación tales como la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía de exclusión por tamaño. Entre éstos, son preferibles los que poseen una alta concentración micelar crítica (CMC), porque ello facilita su eliminación posterior y la reconstitución de la proteína purificada en membranas artificiales para ensayar su actividad.

Cada una de las clases generales de compuestos utilizados para solubilizar proteínas de membrana (agentes caotrópicos, detergentes o solventes orgánicos), ejercen su acción por medio de mecanismos distintos. El término "agente caotrópico" hace referencia a aquéllos aniones inorgánicos, generalmente voluminosos, capaces de aumentar la solubilidad de moléculas hidrofóbicas en el agua. Tal es el caso de los iones SCN^- o ClO_4^- . El efecto de estos iones, denominado también *salting-in*, se contrapone al de otros aniones inorgánicos,

como el SO_4^{2-} , utilizados para precipitar proteínas a partir de sus soluciones (efecto *salting-out*). En general, se acepta que los aniones caotrópicos son desnaturalizantes, en tanto que los aniones que ejercen efecto *salting-out* son estabilizantes de la estructura proteica (disminuyen la solubilidad de los grupos hidrofóbicos en la molécula proteica al aumentar la fuerza iónica de la solución) (Volkin y Klibanov, 1989 (146)). El poder caotrópico de los aniones se correlaciona con la serie liotrópica de Hofmeister:



Los aniones de la izquierda son los de mayor poder estabilizante (*salting-out*), mientras que los de la derecha son los de mayor poder caotrópico.

En el campo de la purificación de las proteínas de mielina, existe una gran discusión acerca de cuál es el sistema idóneo, detergentes o solventes orgánicos, para la caracterización funcional de las proteínas, concretamente de los proteolípidos. En el caso concreto de los proteolípidos, debido a sus particulares propiedades de solubilidad, los solventes orgánicos han sido utilizados profusamente en su aislamiento, purificación y caracterización funcional (Boyan y Clement-Cormier, 1984 (147)). Los defensores de los solventes orgánicos justifican su uso en el hecho de que estos solventes mantienen un entorno hidrofóbico similar al que los proteolípidos encuentran en la membrana. Además, la extracción de la membrana con solventes orgánicos supone que los proteolípidos se extraen asociados a lípidos, sin hacer uso de medios acuosos, con lo cuál la estructura terciaria de la proteína se conserva y, presuntamente, también su actividad biológica (Boyan y Clement-Cormier, 1984 (147)). Uno de los criterios generalmente utilizados para determinar si los proteolípidos purificados están o no desnaturalizados es el de su solubilidad en solventes orgánicos, generalmente en la mezcla cloroformo/metanol 2:1 v/v (CM

2:1). Es ésta una característica no sólo de los complejos lípido-proteína, sino que permanece una vez que los proteolípidos han sido totalmente delipidados. Esto es, es una característica de la apoproteína (Lees y Sakura, 1978 (26)). En general, cuando una disolución de proteolípidos se enriquece en un solvente polar, como puede ser el metanol o el agua, la proteína tiende a agregarse irreversiblemente, volviéndose totalmente insoluble en CM 2:1 o en otros solventes de proteolípidos. Se dice entonces que el proteolípido está desnaturalizado (Folch-Pi y Stoffyn, 1972 (148)). Ello sucede cuando se evaporan soluciones de PLP en mezclas en las que el solvente más polar es el menos volátil, como sucede en el caso del CM 2:1. Sin embargo, si el proceso es suficientemente lento y controlado, los proteolípidos delipidados (apoproteolípidos) pueden ser transferidos a medios acuosos a altas concentraciones sin pérdida de solubilidad. Es decir, en virtud de su alta flexibilidad conformacional los proteolípidos pueden adoptar una conformación hidrosoluble (Lees y Sakura, 1978 (26)).

Una de las aproximaciones más fáciles, aunque quizás demasiado ingenua, para probar si un método determinado produce o no desnaturalización de los proteolípidos, es si la proteína purificada continúa siendo soluble en CM 2:1. Sin embargo, el ensayo funcional, y/o el análisis de estructura secundaria por técnicas espectroscópicas (Infrarrojo, Raman-Láser, Dicroísmo Circular) tienen la última palabra.

Los ensayos funcionales de gran número de proteolípidos han sido llevados a cabo con proteínas aisladas y purificadas con solventes orgánicos. Algunos de los más representativos son: el proteolípido de membranas plasmáticas presinápticas del órgano eléctrico de *Torpedo*, denominado mediatóforo (Israel et al., 1986 (149)); proteolípidos de retículo sarcoplásmico (Knowles et al., 1980 (43)); proteolípidos de membranas plasmáticas de riñón (Torteson y Sapirstein, 1981 (42)), proteolípidos de microorganismos calcifica-

bles (Swain et al., 1989 (150)) y proteolípidos de mielina (Helynck et al., 1983 (49); Cózar et al., 1987 (50)). En el campo de la purificación de los proteolípidos en general, y de las proteínas totales de mielina en particular, la tecnología rápida de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) no ha sido prácticamente explotada, a pesar de sus ventajas inherentes como herramienta analítica y semipreparativa. Ello es debido, en primer término, a que su aplicación a la separación de proteínas, y especialmente a las proteínas de membrana, es bastante reciente, pero en gran medida a la falta de fases móviles adecuadas, con suficiente poder eluotrópico y capacidad de solubilización para permitir la separación de proteínas altamente hidrofóbicas.

En contraposición, otros investigadores abogan por el uso de detergentes por considerar como desnaturalizantes a los solventes orgánicos. Se sabe que muchos solventes orgánicos inactivan o desnaturalizan (Laane et al., 1987 (151)) o al menos desestabilizan o perturban (Arnold, 1988 (152)) la conformación de proteínas enzimáticas. Probablemente ambas posturas son reconciliables en el caso concreto de los proteolípidos, entendiendo por tales a las proteínas intrínsecas de membrana solubles en CM 2:1 en su estado delipidado (apoproteolípidos). En este caso concreto, los solventes orgánicos de baja constante dieléctrica, *a priori* deben reproducir el entorno natural de que disponen en la bicapa, en la cuál están profundamente embebidos, de manera parecida a como lo hacen los detergentes no desnaturalizantes, esto es, reemplazando a los lípidos en la vecindad de la porción hidrofóbica de la proteína de membrana (Helenius et al., 1979 (153)). Esta posibilidad ha sido ampliamente estudiada con el proteolípido de mielina por técnicas espectroscópicas tales como el dicroísmo circular, y más modernamente por espectroscopías infrarroja y Raman-Láser. La apoproteína proteolipídica adopta una conformación mayoritariamente alfa-helicoidal (60%) cuando está disuelta en solventes orgánicos de baja constante dieléctrica, pero adopta una disposición mayoritariamente en lámina β cuando

se fuerza a la proteína a adoptar una conformación hidrosoluble (Folch-Pi y Stoffyn, 1972 (148)). Por otra parte, la proteína aislada junto a sus lípidos, o la apoproteína reconstituida en liposomas adopta una estructura mayoritariamente alfa-helicoidal (Carmona et al., 1988 (34); Surewicz et al., 1987 (35)). Parece, pues, que al menos desde el punto de vista estructural, los solventes orgánicos remedan el entorno lipídico que la proteína encuentra en la membrana, adoptando una conformación semejante. Cuando la polaridad del medio en que están disueltos aumenta, como hemos comentado antes, tienden a la agregación irreversible y a la insolubilización. Desde el punto de vista estructural, los detergentes no iónicos, en concreto el octilglucósido, produce un aumento de estructuras alfa en la apoproteína, efecto similar al de los solventes orgánicos de baja constante dieléctrica o los lípidos (Carmona et al., 1988 (154)). Sin embargo, a falta de datos concluyentes los ensayos funcionales con la proteína purificada por los dos sistemas, solventes orgánicos y detergentes no desnaturizantes, parece el único recurso disponible para reconciliar ambas posturas.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, los objetivos iniciales de esta tesis doctoral fueron:

- 1.- *La purificación de las proteínas de la membrana mielínica utilizando solventes orgánicos, aplicando la tecnología rápida de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC).*
- 2.- *La solubilización y purificación de las proteínas de mielina utilizando detergentes no desnaturizantes. Efectos sobre la estructura secundaria de las cadenas polipeptídicas.*
- 3.- *La extracción selectiva de los lípidos de mielina, libres de proteína, para*

la formación de liposomas. Caracterización bioquímica y morfológica y propiedades de permeabilidad.

- 4.- *La reconstitución de los proteolípidos purificados en los liposomas. Análisis de estructura secundaria sobre la proteína reconstituida y efectos sobre la permeabilidad de las membranas liposomales.*

Cada uno de estos objetivos se detallan en los capítulos III-VI. El capítulo II se dedica a la purificación, caracterización morfológica y bioquímica de la membrana mielínica de cerebro de vaca, que ha sido utilizada para la consecución de los objetivos que componen la presente tesis doctoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- R. Virchow (1854). *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol.* 6:562-572.
- 2.- M.L. Ranvier (1878). *Leçons sur l'Histologie du Systeme Nerveux*. Librairie F. Savy, Paris.
- 3.- Stoffel W. (1990). *The myelin membrane of the central nervous system - Essential macromolecular structure and function*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29:958-976.
- 4.- Morell P., Quarles R.H. y Norton W.T. (1989). *Formation, structure and biochemistry of myelin*. En (G. Siegel, B. Agranoff, R.W. Albers y P. Molinoff, eds): *Basic Neurochemistry, Fourth Edition*. Raven Press, Nueva York. Pp:109-136.
- 5.- Kahn D.W. y Morell P. (1988). *Phosphatidic acid and phosphoinositide turnover in myelin and its stimulation by acetylcholine*. *J. Neurochem.* 50:1542-1550.
- 6.- Tyson C.A., Zande H.V. y Green D.E. (1976). *Phospholipids as ionophores*. *J. Biol. Chem.* 251:1326-1332.
- 7.- Dyer Ch.A. y Benjamins J.A. (1990). *Glycolipids and transmembrane signaling: Antibodies to galactocerebroside cause an influx of calcium in oligodendrocytes*. *J. Cell. Biol.* 111:625-633.
- 8.- Braun P.E. (1984). *Molecular organization of myelin*. En (P. Morell, ed): *Myelin*, 2nd Edition. Plenum Press, Nueva York. Pp:97-116.
- 9.- Harris R. y Findlay J.B.C. (1983). *Investigation of the organization of the major proteins in bovine myelin membranes. Use of chemical probes and bifunctional crosslinking agents*. *Biochim. Biophys. Acta* 732:75-82.
- 10.- Deber C.M. y Reynolds S.J. (1991). *Central nervous system myelin: structure, function, and pathology*. *Clin. Biochem.* 24:113-134.
- 11.- Wood D.D. y Moscarello M.A. (1989). *The isolation, characterization, and lipid-aggregating properties of a citrulline containing myelin basic protein*. *J. Biol. Chem.* 264:5121-5127.
- 12.- Ulmer J.B. (1988). *The phosphorylation of myelin proteins*. *Progress in Neurobiology* 31:241-259.

- 13.- Cruz T.F. y Moscarello M.A. (1985). *Characterization of myelin fractions from human brain white matter*. **J. Neurochem.** 44:1411-1418.
- 14.- Moran O. y Mateu L. (1983). *Loosening of paranodal myelin by repetitive propagation of action potentials*. **Nature** 304:344-345.
- 15.- Tompkins T.A. y Moscarello M.A. (1991). *A 57-kDa phosphatidylinositol-specific phospholipase C from bovine brain*. **J. Biol. Chem.** 266:4228-4236.
- 16.- Chanderkar L.P., Paik W.K. y Kim S. (1986). *Studies on myelin basic protein methylation during mouse brain development*. **Biochem. J.** 240:471-479.
- 17.- Young P.R., Vacante D.A. y Waickus C.M. (1987). *Mechanism of the interaction between myelin basic protein and the myelin membrane: the role of arginine methylation*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 145:1112-1118.
- 18.- Ghosh S.K., Rawal N., Syed S.K., Paik W.K. y Kim S. (1991). *Enzymic methylation of myelin basic protein in myelin*. **Biochem. J.** 275:381-387.
- 19.- Mikoshiba K., Okano H., Tamura T. e Ikenaka K. (1991). *Structure and function of myelin protein genes*. **Annu. Rev. Neurosci.** 14:201-217.
- 20.- Kerlero de Rosbo N., Tsang S. y Bernard C.C.A. (1991). *Comparative study of myelin basic protein isoforms in developing vertebrate central nervous system: absence of 21.5- and 20.2-Kilodalton myelin basic proteins in chicken may point to their importance in mammalian myelinogenesis*. **Dev. Neurosci.** 13:34-40.
- 21.- Gow A. y Smith R. (1989). *The thermodynamically stable state of myelin basic protein in aqueous solution is a flexible coil*. **Biochem. J.** 257:535-540.
- 22.- Surewicz W.K., Moscarello M.A. y Mantsch H.H. (1987). *Fourier transform infrared spectroscopic investigation of the interaction between myelin basic protein and dimyristoylphosphatidylglycerol bilayers*. **Biochemistry** 26:3881-3886.
- 23.- Stoner G.L. (1984). *Predicted folding of β -structure in myelin basic protein*. **J. Neurochem.** 43:433-447.
- 24.- Stoner G.L. (1990). *Conservation throughout vertebrate evolution of the predicted β -strands in myelin basic protein*. **J. Neurochem.** 55:1404-1411.

- 25.- Folch J. y Lees M. (1951). *Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins. Their isolation from brain.* **J. Biol. Chem.** 191:807-817.
- 26.- Lees M.B. y Sakura J.D. (1978). *Preparation of proteolipids.* En (N. Marks y R. Rodnight, eds): **Research Methods in Neurochemistry**, vol. 4. Plenum Press, Nueva York. Pp:345-370.
- 27.- Shaw S.Y., Laursen R.A. y Lees M.B. (1989). *Identification of thiol groups and a disulfide crosslink site in bovine myelin proteolipid protein.* **FEBS Lett.** 250:306-310.
- 28.- Waehneldt T.V., Malotka J., Gunn C.A. y Linington C. (1990). *Myelin proteolipid protein: cladistic tool to study vertebrate phylogeny.* En (Jeserich G., Althaus H.H. y Waehneldt T.V., eds.): **Cellular and Molecular Biology of Myelination**. Springer-Verlag, Berlín. Pp: 361-372.
- 29.- Agrawal H.C., Burton R.M., Fishman A.M., Mitchell R.F. y Prenskey A.L. (1972). *Partial characterization of new myelin protein component.* **J. Neurochem.** 19:2083-2089.
- 30.- Schindler P., Luu B., Sorokine O., Trifilieff E. y Dorsselaer A.V. (1990). *Developmental study of proteolipids in bovine brain: A novel proteolipid and DM-20 appear before proteolipid protein (PLP) during myelination.* **J. Neurochem.** 55:2079-2085.
- 31.- Bizzozero O.A. y Good L.K. (1990). *Myelin proteolipid protein contains thioester-linked fatty acids.* **J. Neurochem.** 55:1986-1992.
- 32.- Bizzozero O.A., Good L.K. y Evans J.C. (1990). *Cysteine-108 is an acylation site in myelin proteolipid protein.* **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 170:375-382.
- 33.- Bizzozero O.A., McGarry J.F. y Lees M.B. (1987). *Autoacylation of myelin proteolipid protein with acyl Coenzyme A.* **J. Biol. Chem.** 262:13550-13557.
- 34.- Carmona P., Ramos J.M., Cózar M. y Monreal J. (1988). *Conformational structure of the central nervous system proteolipid apoprotein. A Raman and infrared spectroscopic study.* **J. Mol. Struct.** 175:43-48.
- 35.- Surewicz W.K., Moscarello M.A. y Mantsch H.H. (1987). *Secondary structure of the hydrophobic myelin protein in a lipid environment as*

determined by Fourier-transform infrared spectrometry. *J. Biol. Chem.* 262:8598-8602.

- 36.- Laursen R.A., Samiullah M. y Lees M.B. (1984). *The structure of bovine brain myelin proteolipid and its organization in myelin.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2912-2916.
- 37.- Stoffel W., Hillen H. y Giersiefen H. (1984). *Structure and molecular arrangement of proteolipid protein of central nervous system myelin.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5012-5016.
- 38.- Hudson L.H., Friedrich V.L., Behar T., Dubois-Dalcq M. y Lazzarini R.A. (1989). *The initial events in myelin synthesis: Orientation of proteolipid protein in the plasma membrane of cultured oligodendrocytes.* *J. Cell Biol.* 109:717-727.
- 39.- Inouye H. y Kirschner D.A. (1989). *Orientation of proteolipid protein in myelin: Comparison of models with X-ray diffraction measurements.* *Dev. Neurosci.* 11:81-89.
- 40.- Popot J.L., Dinh D.P. y Dautigny A. (1991). *Major myelin proteolipid: The 4-alpha-helix topology.* *J. Membrane Biol.* 120:233-246.
- 41.- Swain L.D. y Boyan B.D. (1988). *Ion-translocating properties of calcifiable proteolipids.* *J. Dent. Res.* 67:526-530.
- 42.- Torteson M.T. y Sapirstein V.S. (1981). *Protein interactions with lipid bilayers: The channels of kidney plasma membrane proteolipids.* *J. Membr. Biol.* 63:77-84.
- 43.- Knowles A., Zimniak P., Alfonso M., Zimniak A. y Racker E. (1980). *Isolation and characterization of proteolipids from sarcoplasmic reticulum.* *J. Membr. Biol.* 55:233-239.
- 44.- Morel N., Synguelakis M. y Le Gal la Salle G. (1991). *Detection with monoclonal antibodies of a 15-kDa proteolipid in both presynaptic plasma membranes and synaptic vesicles in Torpedo electric organ.* *J. Neurochem.* 56:1401-1408.
- 45.- Fillingame R.H. (1980). *The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation.* *Ann. Rev. Biochem.* 49:1079-1113.
- 46.- Laursen R.L., Samiullah M. y Lees M. (1983). *Gene duplication in bovine brain myelin proteolipid and homology with related proteins.* *FEBS Lett.* 161:71-74.

- 47.- Lin L.F.H. y Lees M.B. (1984). *Interactions of dicyclohexylcarbodiimide with myelin proteolipid*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:941-945.
- 48.- Ting-Beall H.P., Lees M.B. y Robertson J.D. (1979). *Interactions of proteolipid apoprotein with planar lipid bilayers*. **J. Membr. Biol.** 51:33-46.
- 49.- Helynck G., Luu B., Nussbaum J.L., Picken D., Skolidis G., Trifilieff E., Dorsselaer A.V., Seta P., Sandeaux R., Gavach C., Heitz F., Simon D. y Spach G. (1983). *Brain proteolipids. Isolation, purification and effect on ionic permeability of membranes*. **Eur. J. Biochem.** 133:689-695.
- 50.- Cózar M., Lucas M. y Monreal J. (1987). *Ionophoric properties of the proteolipid apoprotein from bovine brain myelin*. **Biochem. Int.** 14:833-841.
- 51.- Lees M.B. y Macklin W.B. (1988). *Myelin proteolipid protein*. En (P.J. Marangos, C.H. Campbell y R.M. Cohen, eds): **Neuronal and glial proteins: Structure, function, and clinical application**. Academic Press, Nueva York. Pp:267-294.
- 52.- Inouye H. y Kirschner D.A. (1991). *Folding and function of the myelin proteins from primary sequence data*. **J. Neurosci. Res.** 28:1-17.
- 53.- Edwards A.M., Ross N.W., Ulmer J.B. y Braun P.E. (1989). *Interaction of myelin basic protein and proteolipid protein*. **J. Neurosci. Res.** 22:97-102.
- 54.- Campagnoni A.T. (1988). *Molecular biology of myelin proteins from the central nervous system*. **J. Neurochem.** 51:1-14.
- 55.- Hudson L.D., Puckett C., Berndt J., Chan J. y Gencic S. (1989). *Mutation of the proteolipid protein gene PLP in a human X chromosome-linked myelin disorder*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86:8128-8131.
- 56.- Macklin W.B., Gardinier M.V., Obeso Z.O., King K.D. y Wight P.A. (1991). *Mutations in the myelin proteolipid protein gene alter oligodendrocyte gene expression in Jimpy and Jimpy^{msd} mice*. **J. Neurochem.** 56:163-171.
- 57.- Lees M.B. y Cambi F. (1985). *Noncontamination of proteolipid protein preparations by myelin basic protein*. **Ann. Neurol.** 18:268.

- 58.- Satoh J., Sakai K., Endoh M., Koike F., Kunishita T., Namikawa T., Yamamura T. y Tabira T. (1987). *Experimental allergic encephalomyelitis mediated by murine encephalitogenic T cell lines specific for myelin proteolipid apoprotein*. **J. Immunol.** 138:179-184.
- 59.- van der Veen R.C., Trotter J.L., Hickey W.F. y Kapp J.A. (1990). *The development and characterization of encephalitogenic cloned T cells specific for myelin proteolipid protein*. **J. Neuroimmunol.** 26:139-145.
- 60.- Sobel R.A., Tuohy V.K., Lu Z.L., Laursen R.A. y Lees M.B. (1990). *Acute experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice induced by a synthetic peptide of myelin proteolipid protein*. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 49:468-479.
- 61.- Sobel R.A., Tuohy V.K. y Lees M.B. (1991). *Parenteral MHC molecule haplotype expression in (SJL/J x SWR)F1 mice with acute experimental allergic encephalomyelitis induced with two different synthetic peptides of myelin proteolipid protein*. **J. Immunol.** 146:543-549.
- 62.- Endoh M., Kunishita T., Nihei J., Nishizawa M. y Tabira T. (1990). *Susceptibility to proteolipid apoprotein and its encephalitogenic determinants in mice*. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** 92:433-438.
- 63.- Linington C., Gunn C.A. y Lassmann H. (1990). *Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for the rabbit*. **J. Neuroimmunol.** 30:135-144.
- 64.- Shaw S.-Y., Laursen R.A. y Lees M.B. (1986). *Analogous amino acid sequences in myelin proteolipid and viral proteins*. **FEBS Lett.** 207:266-270.
- 65.- Prineas J.W., Kwon E.E., Cho E.-S. y Sharar L.R. (1984). *Continual breakdown and regeneration of myelin in progressive multiple sclerosis plaques*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 436:11-32.
- 66.- Trotter J.L., Wegescheide B.A. y Garvey B.A. (1983). *Immunoreactive myelin proteolipid-like activity in cerebrospinal fluid and serum of neurologically impaired patients*. **Ann. Neurol.** 14:548-554.
- 67.- Johnson D., Hafler D.A., Fallis R.J., Lees M.B., Brady R.O., Quarles R.H. y Weiner H.L. (1986). *Cell-mediated immunity to myelin-associated glycoprotein, proteolipid protein, and myelin basic protein in multiple sclerosis*. **J. Neuroimmunol.** 13:99-108.

- 68.- Quarles R.H. (1983/1984). *Myelin-associated glycoprotein in development and disease*. **Dev. Neurosci.** 6:285-303.
- 69.- Sadoul R., Fahrig T., Bartig U. y Schachner M. (1990). *Binding properties of liposomes containing the myelin-associated glycoprotein MAG to neural cell cultures*. **J. Neurosci. Res.** 25:1-13.
- 70.- Salzer J.L., Holmes W.P. y Colman D.R. (1987). *The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: Homology to the immunoglobulin gene superfamily*. **J. Cell Biol.** 104:957-965.
- 71.- Fujita N., Sato S., Ishiguro H., Inuzuka T., Baba H., Kurihara T., Takahashi Y. y Miyatake T. (1990). *The large isoform of myelin-associated glycoprotein is scarcely expressed in the quaking mouse brain*. **J. Neurochem.** 55:1056-1059.
- 72.- Afar D.E.H., Salzer J.L., Roder J., Braun P.E. y Bell J.C. (1990). *Differential phosphorylation of myelin-associated glycoprotein isoforms in cell culture*. **J. Neurochem.** 55:1418-1426.
- 73.- Pedraza L., Frey A.B., Hempstead B.L., Colman D.R. y Salzer J.L. (1991). *Differential expression of MAG isoforms during development*. **J. Neurosci. Res.** 29:141-148.
- 74.- Owens G.C., Boyd C.J., Bunge R.P. y Salzer J.L. (1990). *Expression of recombinant myelin-associated glycoprotein in primary Schwann cells promote the initial investment of axons by myelinating Schwann cells*. **J. Cell Biol.** 111:1171-1182.
- 75.- Lees M.B. y Sapirstein V.S. (1983). *Myelin-associated enzymes*. En (Lajtha A., ed): **Handbook of Neurochemistry**, vol. 4. Plenum Press, Nueva York. Pp: 435-460.
- 76.- Suzuki K. (1980). *Myelin-associated enzymes*. En (Baumann N., ed.): **Neurological mutations affecting myelination. INSERM Symposium No. 14**. Elsevier, Amsterdam. Pp:333-347.
- 77.- Ledeen R.W. (1984). *Lipid metabolizing enzymes of myelin and their relation to the axon*. **J. Lipid Res.** 25:1548-1554.
- 78.- Norton W.T. y Cammer W. (1984). *Isolation and characterization of myelin*. En (Morell P., ed.): **Myelin, 2nd Edition**. Plenum Press, Nueva York. Pp: 147-195.

- 79.- Tansey F. y Cammer W. (1991). *A Pi form of glutathione-S-transferase is a myelin- and oligodendrocyte-associated enzyme in mouse brain.* **J. Neurochem.** 57:95-102.
- 80.- Kanfer J.N. y McCartney D.G. (1989). *Glycerophosphorylcholine phosphocholine phosphodiesterase activity of rat brain myelin.* **J. Neurosci. Res.** 24:231-240.
- 81.- Vaswani K.K. y Ledeen R.W. (1989). *Phosphatidate phosphohydrolase in purified rat brain myelin.* **J. Neurosci. Res.** 24:431-436.
- 82.- Kunishita T., Vaswani K.K., Morrow C.R., Novak G.P. y Ledeen R.W. (1987). *Ethanolamine kinase activity in purified myelin of rat brain.* **J. Neurochem.** 48:1-7.
- 83.- Waswani K.K. y Ledeen R.W. (1987). *Long chain acyl-CoA synthetase in rat brain myelin.* **J. Neurosci. Res.** 17:65-70.
- 84.- Vaswani K.K. y Ledeen R.W. (1989). *Purified rat brain myelin contains measurable acyl-CoA: Lysophospholipid acyltransferase(s) but little if any glycerol-3-phosphate acyltransferase.* **J. Neurochem.** 52:69-74.
- 85.- Tada Y., Sekiguchi S., Ito F. y Eto Y. (1986). *A methylumbelliferyl lipase in human and mouse brain: A possible localization in myelin.* **J. Neurochem.** 46:140-143.
- 86.- Turner R.S., Chou C.-H.J., Kibler R.F. y Kuo J.F. (1982). *Basic protein in brain myelin is phosphorylated by endogenous phospholipid-sensitive Ca++-dependent protein kinase.* **J. Neurochem.** 39:1397-1404.
- 87.- Wu N.-C. y Ahmad J. (1984). *Calcium- and cyclic AMP-regulated protein kinases of bovine central nervous system myelin.* **Biochem. J.** 218:923-932.
- 88.- Chan K.-F.J. (1988). *Ganglioside-modulated protein phosphorylation. Partial purification and characterization of a ganglioside-inhibited protein kinase in brain.* **J. Biol. Chem.** 263:568-574.
- 89.- Yang S.-D., Liu J.S., Fong Y.-L., Ju J.-S. y Tzen T.-C. (1987). *Endogenous basic protein phosphatases in the brain myelin.* **J. Neurochem.** 48:160-166.
- 90.- Yang S.-D., Liu J.-S., Fong Y.-L. y Yu J.-S. (1987). *Endogenous brain protein phosphatases in the brain myelin.* **J. Neurochem.** 48:160-166.

- 91.- Larocca J.N., Golly F., Makman M.H., Cervone A. y Ledeen R.W. (1990). *Receptor activity and signal transduction in myelin*. En (Jeserich G., Althaus H.H. y Waehneltd T.V., eds.): **Cellular and Molecular Biology of Myelination**. Springer-Verlag, Berlín. Pp: 405-416.
- 92.- Chantry A., Gregson N.A. y Glynn P. (1989). *A novel metalloproteinase associated with brain myelin membranes. Isolation and characterization*. **J. Biol. Chem.** 264:21603-21607.
- 93.- Vogel U.S. y Thompson R.J. (1988). *Molecular structure, localization, and possible functions of the myelin-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*. **J. Neurochem.** 50:1667-1677.
- 94.- Sims N.R. y Carnegie P.R. (1978). *2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*. **Adv. Neurochem.** 3:1-41.
- 95.- Nishizawa Y., Kurihara T., Masuda T. y Takahashi Y. (1985). *Immunohistochemical localization of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in adult bovine cerebrum and cerebellum*. **Neurochem. Res.** 10:1107-1118.
- 96.- Gillespie C.S., Berner L., Brophy P.J. y Colman D.R. (1990). *Biosynthesis of the myelin 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterases*. **J. Neurochem.** 54:656-661.
- 97.- Bradbury J.M. y Thompson R.J. (1984). *Photoaffinity labeling of central nervous system myelin -evidence for an endogenous type I cyclic AMP-dependent kinase phosphorylating the larger subunit of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*. **Biochem. J.** 221:361-368.
- 98.- Starich G.H. y Dreiling D.E. (1980). *Simultaneous inhibition of guinea pig brain 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase and myelin protein synthesis by 2'-adenosine monophosphate*. **Life Sci.** 27:567-572.
- 99.- Sprinkle T.J., Tippins R.B. y Kestler D.P. (1987). *Inhibition of bovine and human brain 2':3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase by heparin and polyribonucleotides and evidence for an associated 5'-polynucleotide kinase activity*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 145:686-691.
- 100.- Pereyra P.M., Horvath E. y Braun P.E. (1988). *Triton X-100 extractions of central nervous system myelin indicate a possible role for the minor myelin proteins in the stability of lamellae*. **Neurochem. Res.** 13:583-595.
- 101.- Gillespie C.S., Willson R., Davidson A. y Brophy P.J. (1989). *Characteri-*

zation of a cytoskeletal matrix associated with myelin from rat brain. *Biochem. J.* 260:689-696.

- 102.- Braun P.E., De Angelis D., Shtybel W.W. y Bernier L. (1991). *Isoprenoid modification permits 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase to bind to membranes.* *J. Neurosci. Res.* 30:540-544.
- 103.- Eto Y. y Suzuki K. (1973). *Cholesterol ester metabolism in rat brain. A cholesterol ester hydrolase specifically localized in the myelin sheath.* *J. Biol. Chem.* 248:1986-1991.
- 104.- Igarashi M. y Suzuki K. (1977). *Solubilization and characterization of the rat brain cholesterol ester hydrolase localized in the myelin sheath.* *J. Neurochem.* 28:729-738.
- 105.- Cammer W. (1991). *Carbonic anhydrase in myelin and glial cells in the mammalian central nervous system.* En (Dogson J., Tashian R.E., Gros G. y Carter N.D., eds.): *The carbonic anhydrases.* Plenum Publishing Corporation, Nueva York. Pp: 325-332.
- 106.- Sapirstein V.S. y Lees M.B. (1978). *Purification of myelin carbonic anhydrase.* *J. Neurochem.* 31:505-511.
- 107.- Naidoo D. (1962). *The activity of 5'-nucleotidase determined histochemically in the developing rat brain.* *J. Histochem. Cytochem.* 10:421-434.
- 108.- Cammer W., Sirota S.R., Zimmerman T.R. y Norton W.T. (1980). *5'-Nucleotidase in rat brain myelin.* *J. Neurochem.* 35:367-373.
- 109.- Casadó V., Mallol J. y Bozal J. (1988). *Isolation and characterization of bovine brain myelin distribution of 5'-nucleotidase.* *Neurochem. Res.* 13:349-357.
- 110.- Casadó V., Mallol J., Lluís C., Franco R. y Canela E.I. (1991). *Adenosine receptors in myelin fractions and subfractions: The effect of the agonist (R)-Phenylisopropyladenosine on myelin membrane microviscosity.* *J. Neurochem.* 57:1623-1629.
- 111.- Reiss D.S., Lees M.B. y Sapirstein V.S. (1981). *Is Na + K ATPase a myelin-associated enzyme?* *J. Neurochem.* 36:1418-1426.
- 112.- Shantharam P. y SrinivasaRao P. (1989). *Activity of myelin membrane Na+/K+-ATPase and 5'-nucleotidase in relation to phospholipid acyl profiles, ganglioside composition and phosphoinositides in developing brains of undernourished rats.* *Biochim. Biophys. Acta* 982:115-122.

- 113.- Yanagisawa K., Sato S., O'Shannessy D.J., Quarles R.H., Suzuki K. y Miyatake T. (1988). *Myelin-associated calpain II*. **J. Neurochem.** 51:803-807.
- 114.- Sato S., Yanagisawa K. y Miyakate T. (1984a). *Conversion of myelin-associated glycoprotein (MAG) to a smaller derivative by calcium-activated neutral protease (CANP)-like enzyme in myelin and inhibition by E-64 analogue*. **Neurochem. Res.** 9:629-635.
- 115.- Sato S., Quarles R.H., Brady R.O. y Tourtellotte W.W. (1984b). *Elevated neutral protease activity in myelin from brains from patients with multiple sclerosis*. **Ann. Neurol.** 15:264-267.
- 116.- Chakrabarti A.K., Dasgupta S., Banik N.L. y Hogan E.L. (1990). *Regulation of the calcium-activated neutral proteinase (CANP) of bovine brain by myelin lipids*. **Biochim. Biophys. Acta** 1038:195-198.
- 117.- Chakrabarti A.K., Banik N.L., Powers J.M. y Hogan E.L. (1989). *The regional and subcellular distribution of calcium activated neutral proteinase (CANP) in the bovine central nervous system*. **Neurochem. Res.** 14:259-266.
- 118.- Larocca J.N., Cervone A. y Ledeen R.W. (1987). *Stimulation of phosphoinositide hydrolysis in myelin by muscarinic agonist and potassium*. **Brain Res.** 436:357-362.
- 119.- Cochary E.F., Bizzozero O.A., Sapirstein V.S., Nolan Ch.E. y Fischer I. (1990). *Presence of the plasma membrane proteolipid (plasmolipin) in myelin*. **J. Neurochem.** 55:602-610.
- 120.- Fischer I., Cochary E.F., Konola J.T. y Romano-Clarke G. (1991). *Expression of plasmolipin in oligodendrocytes*. **J. Neurosci. Res.** 28:81-89.
- 121.- Sapirstein V.S., Nolan Ch.E., Fischer I., Cochary E., Blau S. y Flynn Ch.J. (1991). *The phylogenic expression of plasmolipin in the vertebrate nervous system*. **Neurochem. Res.** 16:123-128.
- 122.- Barres B.A., Chun L.L.Y. y Corey D.P. (1988). *Ion channel expression by white matter glia: I. Type 2 astrocytes and oligodendrocytes*. **Glia** 1:10-30.
- 123.- Dyer C.A., Hickey W.F. y Geiser E.E. (1991). *Myelin/oligodendrocyte-specific protein: A novel surface membrane protein that associates with microtubules*. **J. Neurosci. Res.** 28:607-613.

- 124.- Linington C., Webb M. y Woodhamis P.L. (1984). *A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody*. **J. Neuroimmunol.** 6:387-396.
- 125.- Schluesener H.J., Sobel R.A., Linington C. y Weiner H.L. (1987). *A monoclonal antibody against a myelin-oligodendrocyte glycoprotein induces relapses and demyelination in central nervous system autoimmune disease*. **J. Immunol.** 139:4016-4021.
- 126.- Miller S.L., Ötvös-Papp E., Prichett W. y Meyer R.D. (1989). *Detection and partial biochemical characterization of a novel 57,500 dalton protein in rat brain myelin*. **J. Neurosci. Res.** 22:262-268.
- 127.- Zanetta J.P., Warter J.M., Lehmann S., Kuchler S. y Vincendon G. (1991). *La CSL (cerebellar soluble lectin) joue-t-elle le rôle de cible immunologique privilégiée dans la sclérose en plaques?* **Path. Biol.** 39:7-11.
- 128.- Reig J.A., Ramos J.M., Cózar M., Aguilar J.S., Criado M. y Monreal J. (1982). *Purification and chemical characterization of a W2 protein from brain myelin*. **J. Neurochem.** 39:507-511.
- 129.- Bunge R.P., Bunge M.B. y Eldridge C.F. (1986). *Linkage between axonal ensheathment and basal lamina production by Schwann cells*. **Ann. Rev. Neurosci.** 9:305-328.
- 130.- Robertson W. (1899): *On a new method of obtaining a black reaction in certain tissue-elements of the central nervous system (platinum method)*. **Scott. Med. Surg. J.** 4:23-30.
- 131.- Del Río Hortega P. (1921). *Estudios sobre la neuroglía: La glía de escasas radiaciones (oligodendroglía)*. **Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat.** 21:63-92.
- 132.- Del Río Hortega P. (1928). *Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía*. **Mem. R. Soc. Esp. Hist. Nat.** 14:5-122.
- 133.- Lubetzki C. y Zalc B. (1990). *Myéline et oligodendrocytes: Aspects récents*. **Rev. Neurol. (Paris)**. 146:645-654.
- 134.- Raff M.C., Miller R.H. y Noble M. (1983). *A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium*. **Nature** 303:390-396.

- 135.- Richardson W.D., Pringle N., Mosley M.J., Westermarck B. y Dubois-Dalcq M. (1988). *A role for platelet derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system.* **Cell** 53:309-319.
- 136.- McKinnon R.D., Matsui T., Aaronson S. y Dubois-Dalcq M. (1989). *FGF inhibits myelin gene expression and induces the PDGF A receptor in differentiating O-2A glial progenitor cells.* **J. Cell Biol.** 109:97-102.
- 137.- Franklin R.J.M., Crang A.J. y Blakemore W.F. (1991). *Transplanted type-1 astrocytes facilitate repair of demyelinating lesions by host oligodendrocytes in adult rat spinal cord.* **J. Neurocytol.** 20:420-430.
- 138.- Raff M.C. (1989). *Glial cell diversification in the rat optic nerve.* **Science** 243:1450-1455.
- 139.- Levine J.M. (1989). *Neuronal influences on glial progenitor cell development.* **Neuron** 3:103-113.
- 140.- Dubois-Dalcq M., Behar T., Hudson L. y Lazzarini R.A. (1986). *Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons.* **J. Cell Biol.** 102:384-392.
- 141.- Monge M., Kadiiski D., Jacque C. y Zalc B. (1986). *Oligodendroglial expression and deposition of four major myelin constituents in the myelin sheath during development: an in vivo study.* **Dev. Neurosci.** 8:222-235.
- 142.- Owens G.C. y Bunge R.P. (1989). *Evidence for an early role for myelin-associated glycoprotein in the process of myelination.* **Glia** 2:119-128.
- 143.- Macklin W.B., Weill C.L. y Deininger P.L. (1986). *Expression of myelin proteolipid and basic protein mRNAs in cultured cells.* **J. Neurosci. Res.** 16:203-217.
- 144.- Monuki E.S., Weinmaster G., Kuhn R. y Lemke G. (1989). *SCIP: a glial POU domain gene regulated by cyclic AMP.* **Neuron** 3:783-793.
- 145.- Tandford Ch. y Reynolds J.A. (1986). *Characterization of membrane proteins in detergent solutions.* **Biochim. Biophys. Acta** 457:133-170.
- 146.- Volkin D.B. y Klibanov A.M. (1989). *Minimizing protein inactivation.* En (Creighton T.E., ed.): **Protein function. A practical approach.** IRL Press, Oxford. Pp. 1-24.

- 147.- Boyan B.D. y Clement-Cormier Y. (1984). *Organic solvent extraction of membrane proteins*. En (Venter J.C. y Harrison L.C., eds.): **Membranes, Detergents and Receptor Solubilization**. Alan R. Liss, Nueva York. Pp. 47-63.
- 148.- Folch-Pi J. y Stoffyn P.J. (1972). *Proteolipids from membrane systems*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 195:86-107.
- 149.- Israël M., Morel N., Lesbats B., Birman S., y Manaranche R. (1986). *Purification of a presynaptic membrane protein that mediates a calcium dependent translocation of acetylcholine*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 83:9226-9230.
- 150.- Swain L.D., Renthall R.D. y Boyan B.D. (1989). *Resolution of ion translocating proteolipid subclasses active in bacterial calcification*. **J. Dental Res.** 68:1094-1097.
- 151.- Laane C., Boeren S., Vos K. y Veeger C. (1987). *Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents*. **Biotechnol. Bioeng.** 30:81-87.
- 152.- Arnold F.H. (1988). *Protein design for non-aqueous solvents*. **Protein Eng.** 2:21-25.
- 153.- Helenius A., McCaslin D.R., Fries E. y Tandford Ch. (1979). *Properties of Detergents*. **Methods in Enzymology** 56:734-749.
- 154.- Carmona P., de Cózar M., García-Segura L.M. y Monreal J. (1988). *Conformation of brain proteolipid apoprotein. Effects of sonication and n-octyl- β -D-glucopyranoside detergent*. **Eur. Biophys. J.** 16:169-176.

CAPITULO II

PURIFICACION DE LA MEMBRANA MIELINICA
DEL CEREBRO
CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y BIOQUIMICA

INTRODUCCION

En general, todos los procedimientos de aislamiento y purificación de la membrana mielínica se basan en el principio de que al homogeneizar el tejido nervioso en sacarosa isotónica de baja fuerza iónica, la mielina se separa de los axones y forma vesículas en el rango de tamaños de mitocondrias y núcleos. Ello unido a la alta relación lípido/proteína que tiene esta membrana, otorga a estas vesículas la densidad más baja de todas las fracciones de membrana del sistema nervioso. Esta propiedad permite su aislamiento por centrifugación diferencial o por centrifugación en gradiente de densidad, normalmente de sacarosa. Los métodos utilizados se pueden dividir en dos grandes categorías según utilicen un tipo u otro de centrifugación.

En general, cuando el objetivo se centra en la purificación de mielina, y no interesan otras fracciones de sistema nervioso, la mayoría de investigadores utilizan métodos basados en la centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. Para ello, los homogeneizados de cerebro completo o de sustancia blanca en una solución de sacarosa 0.32 M se depositan sobre una solución más densa (típicamente 0.85 M) de sacarosa y se centrifugan, en cuyo caso la membrana mielínica permanece en la interfase. Alternativamente, se pueden preparar los homogeneizados de cerebro en solución densa de sacarosa, en cuyo caso la mielina permanece flotando en su superficie tras la centrifugación. Con ambos procedimientos los núcleos, las mitocondrias y los sinaptosomas, en principio, migran a través de la solución densa de sacarosa y forman un precipitado en el fondo del tubo. Las membranas microsomales también deberían formar un precipitado o permanecer parcialmente suspendidas en esta capa. En la práctica, sin embargo, la mielina obtenida con un único paso de centrifugación en gradiente contiene contaminantes de otras fracciones celulares, principalmente de axolema, membranas plasmáticas de células gliales, fragmentos de retículo endoplásmico y contaminantes axoplasmáticos, por lo que se hace precisa la

utilización de nuevas etapas de purificación. Estas generalmente comienzan con un choque osmótico con agua, a fin de que el material atrapado, incluidos los axones, se liberen de la fracción de mielina, seguido de un nuevo paso por centrifugación en gradiente para separarlos.

En este capítulo se describe el método que se utilizó para purificar la membrana mielínica a partir de cerebro bovino, basado en el de Norton y Poduslo (1973 (1)), y se muestran los resultados concernientes a su caracterización morfológica y bioquímica.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Los cerebros de vaca se obtuvieron del matadero municipal de Madrid a partir de animales sacrificados en el momento, y se transportaron hasta el laboratorio en baño de hielo. La sacarosa, las placas para cromatografía en capa fina, el fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), el dodecilsulfato sódico (SDS), el ácido tricloroacético y los reactivos para la electroforesis fueron suministradas por Merck (Alemania). Los nucleótidos y el octilglucósido (OG) utilizados en las determinaciones enzimáticas fueron de Sigma (EEUU). El reactivo de plata para la tinción de los geles de electroforesis fue de Bio-Rad. El Triton X-100 se adquirió a BDH (Inglaterra). El durcupan ACM y el óxido de propileno fueron de Fluka (Suiza).

Purificación de la membrana miélinica

Todas las etapas del procedimiento que se indica se realizaron a 0-4 °C, y todas las soluciones utilizadas se preenfriaron a esta temperatura antes de ser usadas. Las soluciones de sacarosa se prepararon en tampón Tris-HCl 0.1 M y PMSF 1 mM como inhibidor de proteasas.

La sustancia blanca, diseccionada a partir de los hemisferios cerebrales, se trocó finamente y se lavó repetidas veces con solución salina (NaCl 0.9 %) para eliminar restos de sangre, y se homogeneizó al 10% (p/v) en solución de sacarosa 0.32 M utilizando una batidora durante 1 minuto a máxima velocidad (en cuatro intervalos de 15 s), y un homogeneizador manual de vidrio tipo *Potter*. El homogeneizado se centrifugó a 5000 g durante 20 minutos en un rotor Sorvall SS-34, se desechó el sobrenadante, y el precipitado se lavó dos veces con sacarosa 0.32 M en idénticas condiciones de centrifugación. Con éstos lavados previos (Waehneltdt y Mandel, 1970 (2)) se eliminan proteínas solubles y contaminantes microsomales. El precipitado final, resuspendido en sacarosa 0.32

M, se depositó cuidadosamente sobre una solución de sacarosa 0.85 M, previamente distribuida en tubos de nitrato de celulosa para el rotor SW-27 de Beckman (18 ml/tubo). Se centrifugó a 23000 rpm durante 30 minutos, y el material colectado en la interfase se sometió a un choque osmótico resuspendiéndolo en diez volúmenes de agua (conteniendo PMSF 1 mM). Se centrifugó a 23500 g en rotor SS-34, se desechó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en otros 10 volúmenes de agua y se centrifugó en las mismas condiciones. Sobre el material sedimentado se repitió el paso de centrifugación en gradiente, resuspendiéndolo en sacarosa 0.32 M, depositándolo sobre la solución de sacarosa 0.85 M y centrifugando a 23000 rpm en rotor SW-27 durante 45 minutos. La mielina purificada, que permanece en la interfase tras la centrifugación, se lavó tres veces con diez volúmenes de agua, como arriba, y se congeló con nitrógeno líquido, tras lo cual se liofilizó, o bien se conservó a -80 °C hasta su uso.

Microscopía electrónica (secciones ultrafinas)

Las muestras de membrana mielínica purificada se sedimentaron en una microfuga (Beckman) a 13.000 r.p.m. (11.900 g) y se fijaron en glutaraldehído al 4% en tampón fosfato 1 mM, pH 8, durante 4 h a temperatura ambiente. Se dejaron lavando en tampón fosfato durante una noche, y se llevó a cabo una postfijación con tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.4, durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las muestras con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 tres veces en ciclos de 10 min. y se deshidrataron gradualmente según el siguiente esquema: alcohol etílico de 50^o (tres veces durante 15 min cada una), alcohol etílico de 70^o (tres veces durante 15 min cada una), alcohol etílico de 70^o con acetato de uranilo al 1% (durante toda la noche, en nevera y en la oscuridad), alcohol de 96^o (tres veces durante 15 min cada una) y alcohol absoluto (tres veces durante 15 min cada una). A continuación se lleva

a cabo la inclusión de las muestras añadiendo óxido de propileno (dos veces durante 10 min cada vez), óxido de propileno - durcupan ACM (1/1) durante 10 min y por último durcupan ACM. Este último paso se realiza poniendo en las cápsulas una gota de la mezcla de durcupan ACM, a continuación las muestras, y completando el volumen de la cápsula con durcupan ACM. Se dejó polimerizar la resina en estufa a 56°C durante tres días.

Los bloques polimerizados se cortaron en ultramicrotomo (Reichert-Jung), con cuchillas de vidrio (LKB), consiguiéndose cortes de un espesor entre 60 y 90 nm, que se recogieron sobre rejillas de microscopía de 200 mesh precubiertas con Formvar.

Las rejillas con las muestras se sometieron a una posterior tinción con citrato de plomo para aumentar el contraste. Para ello se coloca la rejilla con los cortes ultrafinos sobre una gota de la solución de citrato de plomo durante cinco minutos, en atmósfera de NaOH (formada con unas cuantas perlas de NaOH) para evitar que se formen precipitados de carbonato de plomo. La solución de citrato de plomo se prepara disolviendo 1.33 g de nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) y 1.76 g de citrato sódico ($\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) en 30 g de agua. Después de 30 min se añaden 8 ml de NaOH 1N y se completa hasta 50 ml con agua. Para la tinción, ésta solución se diluye 100 veces con NaOH 0.01N antes de ser usada. Las rejillas se observaron al microscopio electrónico (Jeol 1200 EX II).

Caracterización analítica de la membrana purificada

Se determinó el contenido en proteína, fosfolípidos y colesterol de la membrana purificada liofilizada utilizando técnicas analíticas espectrofotométricas. La proteína se determinó por el método de Lowry et al., 1951 (3), incluyendo un 3% de dodecilsulfato sódico (SDS) en el reactivo C (Aguilar et al., 1982 (4)), y utilizando seroalbúmina bovina como patrón. El contenido en fosfolípidos se dedujo a partir de la determinación de fósforo en las muestras,

por el método de Ames y Dubin, 1960 (5), utilizando una solución de KH_2PO_4 1 mM como patrón; el tanto por ciento de fósforo encontrado en las muestras se multiplicó por 25 para calcular el tanto por ciento de fosfolípidos (Autilio y Norton, 1963 (6)). El contenido en colesterol se determinó por el método enzimático de Siedel et al., 1981 (7), utilizando un *kit* comercial suministrado por Boehringer-Mannheim (Alemania). Como patrón se utilizó colesterol puro de Fluka (Suiza).

Cromatografía en capa fina de lípidos polares y neutros

Los lípidos polares y neutros presentes en la mielina purificada se identificaron mediante cromatografía sobre placas HPTLC de 10x20 cm precubiertas con gel de sílice 60 (sin indicador fluorescente) (Merck). Los lípidos de la membrana se extrajeron por el método de Folch et al., 1957 (8), con la mezcla cloroformo/metanol 2:1 v/v (CM 2:1). La fase inferior, lavada, se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno, y el residuo se redisolvió en un pequeño volumen de CM 2:1. Aliquotas de estas soluciones se sembraron en las placas, utilizando una jeringa *Hamilton*. Se utilizó un doble desarrollo monodimensional para lípidos polares y lípidos neutros. Brevemente, las placas se lavaron totalmente, en sentido longitudinal, introduciéndolas en una cubeta con n-hexano/éter etílico 1:1 (v/v) y dejando que el solvente ascendiera hasta el borde superior; se secaron con un secador de aire, y luego se sembraron las muestras formando una banda continua de 1 cm, a 1 cm del extremo inferior de la placa. Se introdujeron en las cubetas presaturadas con el solvente de lípidos polares (cloroformo/acetato de metilo/n-propanol/metanol/solución acuosa de KCl al 0.25% 25:25:25:10:9, por volumen) (Vitiello y Zanetta, 1978 (9)), y se dejaron desarrollar hasta una longitud de 12 cm medidos desde el borde inferior de la placa. Esta distancia resultó ser la más adecuada para la resolución completa y simultánea de los lípidos polares y los lípidos neutros. Las placas

se secaron con secador y se introdujeron en un desecador con cloruro cálcico a vacío durante 30 minutos. Luego se introdujeron en la cubeta presaturada con el solvente para lípidos neutros (n-hexano/éter etílico/ácido acético glacial 80:20:2 por volumen) en la misma dirección, completándose el desarrollo hasta el extremo superior de la placa (Olsen y Henderson, 1989 (10)). Se secaron con secador y se revelaron con el reactivo de acetato de cobre (acetato de cobre al 3 % p/v en ácido ortofosfórico al 8 % v/v). Las placas se nebulizaron intensamente con este reactivo y se calentaron a 160 °C durante 20 minutos en estufa.

Electroforesis de las proteínas

Preparación de las muestras

La membrana mielínica purificada se disolvió por completo en solución de SDS al 2.5% en Na_2CO_3 1% con la ayuda de un sonicador de baño (Bransonic), a una concentración de 3 mg de proteína/ml. Antes de la electroforesis, las proteínas en solución se transfirieron al tampón de muestras para la electroforesis (2.5% SDS en Tris-HCl 0.25 M, pH 6.8) utilizando minicolumnas de Sephadex G-25. Brevemente, se empaquetan jeringas de insulina de 1 ml con Sephadex G-25 hinchado en agua. Se equilibran extensivamente con el tampón de electroforesis (al menos 2 ml por jeringa) y se centrifugan a baja velocidad durante 3 minutos en centrífuga de mesa con cabezal oscilante, colgándolas de tubos de plástico de 10 ml. Se añade la solución de mielina sobre las jeringas centrifugadas (hasta 200 μl /jeringa), y se vuelven a centrifugar en las mismas condiciones colgándolas sobre un nuevo tubo. Este sistema resultó especialmente útil para producir una "diálisis instantánea" en muestras de pequeño volumen (50-200 μl), muy difíciles de dializar en un tubo de diálisis convencional. Con ello se consigue la sustitución de un tampón por el otro (eliminando totalmente el carbonato sódico), sin dilución de las muestras (se obtiene exactamente el mismo volumen que se añade a la columna) y con una alta

recuperación de proteína (90% para volúmenes de 200 μ l), independientemente de la concentración de proteína que tenga la solución inicial (en un ensayo previo la recuperación de proteína no varió dentro del rango de concentraciones de 0.2 a 3 mg/ml).

Condiciones de la electroforesis y método de tinción

A todas las muestras se les añadió glicerol (10%) y azul de bromofenol (10 μ g/ml). El desarrollo de los geles (7 x 8 cm, 0.75 mm de grosor) se realizó de acuerdo a Laemmli (1970 (11)), usando geles isocráticos con un 14% de acrilamida. Las muestras, conteniendo entre 5 y 20 μ g de proteína, se cargaron sobre un gel concentrador (*stacking gel*) de acrilamida al 3%. Se utilizó una unidad vertical *Mighty Small II* (Hoeffer Scientific Instruments), con una corriente de 3 mA, hasta que el azul de bromofenol llegó hasta la parte inferior del gel (aproximadamente una hora). Los geles se tiñeron con plata utilizando un *kit* comercial suministrado por los laboratorios Bio-Rad. Como proteínas de referencia, de pesos moleculares conocidos, se usaron: fosforilasa b, seroalbúmina bovina, ovalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de soja y alfa-lactalbúmina (94, 67, 43, 30, 20.1 y 14.4 KDa, respectivamente), adquiridas a Pharmacia.

Determinaciones enzimáticas

2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa, EC 3.1.4.37)

Se utilizó el método de Prohaska et al., 1973 (12), excepto en que el fosfato inorgánico liberado en la reacción se midió por la reacción colorimétrica del reactivo ascórbico-molibdato (Ames y Dubin, 1960 (5)). Las muestras de mielina se homogeneizaron en baño de hielo a una concentración de 1 mg de proteína/ml en tampón Tris-maleato 50 mM, pH 6.2, en presencia o ausencia de octilglucósido 60 mM (concentración final), con la ayuda de un homogeneiza-

dor manual de vidrio tipo *Potter*. Alicuotas de 20 μ l de las muestras (20 μ g de proteína) se añadieron sobre 200 μ l de tampón Tris-maleato 50 mM, pH 6.2 conteniendo el sustrato (2',3'-AMPc 7.5 mM, concentración final). La reacción se mantuvo durante 10 minutos a 30 °C y, transcurrido este tiempo, se paró introduciendo los tubos en un baño de agua hirviendo durante 1 minuto. Durante este tiempo, la CNPasa hidroliza al 2',3'-AMPc produciendo cantidades equimolares de 2'-AMP. A partir de éste, por reacción de la fosfatasa alcalina, se liberan cantidades equimolares de fosfato inorgánico: sobre los tubos hervidos se añadieron 100 μ l de tampón $MgCl_2$ 21 mM, Tris-HCl 0.3 M, pH 9, y 0.72 unidades de fosfatasa alcalina de *E. coli* (Sigma), y se incubaron a 30 °C durante 20 minutos. El fosfato inorgánico liberado se midió en alicuotas de 5-10 μ l de los medios de incubación mediante la reacción colorimétrica con el reactivo ascórbico-molibdato (formado al mezclar 1 volumen de ácido ascórbico al 10% (p/v) en agua con 6 volúmenes de molibdato amónico tetrahidratado al 0.42% (p/v) en ácido sulfúrico 1N). Las alicuotas tomadas de los medios de incubación se completan hasta un volumen de 100 μ l con agua destilada, y se añaden 900 μ l del reactivo ascórbico-molibdato. Se deja desarrollar el color incubando todos los tubos a 45 °C durante 20 min., y se lee la absorbancia a 820 nm. Como solución patrón se utilizó KH_2PO_4 1 mM.

5'-nucleotidasa (EC 3.1.3.5)

Se utilizó el método de Rodríguez de Lores Arnáiz et al., 1988 (13), en las condiciones de pH y concentraciones de sustrato y $MgCl_2$ usadas por Cammer et al., 1980 (14). Las muestras de mielina se homogeneizaron en tampón KCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, en baño de hielo con la ayuda de un homogeneizador de vidrio tipo *Potter*, a una concentración de 15-30 mg de proteína/ml, y se mantuvieron en baño de hielo hasta el inicio del ensayo.

Alicuotas de 20 μl de las muestras se añadieron sobre 267 μl del tampón de arriba, conteniendo el sustrato (5'-AMP, 12.5 mM concentración final), y se mantuvo la reacción durante 45 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción añadiendo a todos los tubos 5 μl de ácido tricloroacético al 40%. Estos se centrifugaron en una microfuga para tubos *Eppendorff* (Beckman) a máxima velocidad durante 15 minutos, y se midió el fosfato inorgánico liberado en alicuotas de 25-100 μl de sobrenadante, por la reacción colorimétrica del reactivo ascórbico-molibdato, como arriba. Como controles se utilizaron tubos conteniendo muestra y sustrato, pero incubados a 0 °C.

ATPasas

El método utilizado se basa en el procedimiento de Rodríguez de Lores Arnáiz et al., 1988 (13), incorporando al medio de reacción azida sódica 4 mM para inhibir ATPasas mitocondriales, como recomiendan Reiss et al., 1981 (15).

El método se basa en determinar la hidrólisis del ATP mediante la liberación de fosfato inorgánico tras la incubación de las muestras con el sustrato. Si en el medio de ensayo se incluyen iones Na^+ , K^+ y Mg^{2+} , se mide la actividad ATPásica total de la muestra (la suma de Mg^{2+} -ATPasa y Na^+ , K^+ -ATPasa). Por el contrario, si en el medio se incluye únicamente iones Mg^{2+} , y además se añade un inhibidor específico de la Na^+ , K^+ -ATPasa (ouabaina), entonces sólo se mide la actividad de la Mg^{2+} -ATPasa. Por diferencia entre la actividad ATPásica total y la de la Mg^{2+} -ATPasa se determina la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa. Así mismo, el grado de contaminación mitocondrial de la mielina puede determinarse midiendo la actividad ATPásica total en ausencia y presencia de azida sódica 4 mM.

El tampón para la determinación de ATPasas totales fue: NaCl 100 mM, KCl 20 mM, MgCl_2 3 mM, ATP 4 mM, NaN_3 4 mM, Tris-HCl 0.16 M, pH 7.4. Para la determinación de Mg^{2+} -ATPasa se usó el medio siguiente: MgCl_2

3 mM, ouabaína 1 mM, ATP 4 mM, NaN_3 4 mM, Tris-HCl 0.16 M, pH 7.4.

Las muestras de mielina se homogeneizaron en tampón Tris-HCl 0.16 M, pH 7.4, a una concentración de 20-25 mg de proteína/ml, en presencia o ausencia de deoxicolato sódico al 0.1%. Todas las muestras y los medios de reacción se preincubaron a 37 °C durante 10 minutos. Luego, alícuotas de 30 μl de las muestras (100-300 μg de proteína) se añadieron sobre los tubos conteniendo 400 μl del medio de reacción correspondiente, se agitaron los tubos, y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Como controles, se incubaron tubos equivalentes, conteniendo muestra y sustrato, a 0 °C. La reacción se paró añadiendo 10 μl de ácido tricloroacético al 40%, se centrifugaron los tubos, y se midió el fosfato inorgánico liberado en los sobrenadantes por la reacción del reactivo ascórbico-molibdato.

Anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1)

Se utilizó el método de Sapirstein y Lees, 1978 ((16), a su vez inspirado en el método colorimétrico de Maren, 1960 (17). El método se basa en determinar la velocidad de cambio del pH mediante un indicador, el rojo de fenol, en ausencia y en presencia de la enzima.

La solución indicadora está compuesta por rojo fenol 1.25 mg/ml en Na_2CO_3 2.6 mM, y se saturó con anhídrido carbónico, en baño de hielo, durante al menos una hora antes de comenzar los experimentos. A lo largo de todo el tiempo en que se realizaron los ensayos, se borboteó gas carbónico sobre esta solución. La reacción se llevó a cabo en tubos de vidrio (7.5 cm x 7 mm), y todas las soluciones y muestras se mantuvieron en baño de hielo. Sobre el fondo de los tubos se pipetearon 70 μl de tampón Na_2CO_3 0.3 M, NaHCO_3 0.206 M, pH 9.0, y sobre él, se pipetearon 10-50 μl de suspensión de mielina (25 mg proteína/ml, en presencia o ausencia de Triton X-100 al 1%). Se agitó a baja velocidad en *vortex*, procurando que la muestra se mezclara homogénea-

mente con el tampón, pero sin que ninguna gota se proyectara hacia las paredes del tubo, y se volvió a colocar en el baño de hielo. Luego se añadieron 500 μ l de la solución indicadora de rojo fenol, se tapó inmediatamente el tubo con el dedo y se agitó en *vortex* a baja velocidad hasta que el color rojo vinoso del indicador vira al amarillo. Se realizaron blancos sin muestra, o con muestra hervida durante 3 minutos, para determinar el **tiempo de reacción no catalizado**. El tiempo que tarda en virar el indicador en los tubos que contienen muestra se denomina **tiempo catalizado**. La actividad enzimática se calculó mediante la ecuación:

$$AE = \frac{\text{tiempo no catalizado} - \text{tiempo catalizado}}{\text{tiempo catalizado}}$$

Una unidad de actividad enzimática corresponde, por tanto, a una reducción en el 50% del tiempo no catalizado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Por el procedimiento que se describe en Materiales y Métodos se consigue un alto rendimiento de membrana mielínica purificada con alto grado de pureza. A partir de 50 g de sustancia blanca fresca se consiguen como promedio 2.25 g de membrana purificada liofilizada, ó 28 g de membrana purificada fresca con una concentración media de proteína total de 25 mg/ml. Como criterios de pureza de la membrana se eligieron: la morfología, el análisis bioquímico cuantitativo y cualitativo, y las actividades de varios marcadores enzimáticos.

Desde el punto de vista morfológico (Figura 6), la preparación obtenida muestra las estructuras típicamente multilamelares, con bandeo característico producido por la alternancia de líneas electrónicamente densas (líneas densas principales) con otras más transparentes (intraperíodos), de morfología muy semejante a la que muestran las vainas de mielina *in vivo*. No se observó la presencia de orgánulos subcelulares como mitocondrias, ni tampoco de sinaptosomas, axones o núcleos.

El análisis bioquímico cuantitativo (Tabla 3) reveló unos resultados muy parecidos a los descritos en la bibliografía para la mielina bovina del sistema nervioso central, reflejando una alta relación lípido/proteína (3:1, en peso), y la presencia de altas cantidades de colesterol y galactolípidos.

Las clases lipídicas que forman parte de la mielina purificada se analizaron por HPTLC, utilizando un doble desarrollo monodimensional para lípidos polares y lípidos neutros (Figura 7). Las clases más abundantes fueron los cerebrósidos (que se separan en dos bandas de distinta movilidad según si el ácido graso que está unido a la esfingosina está o no alfa-hidroxilado), el colesterol y los fosfoglicéridos de etanolamina. Estos últimos son más abundantes que los fosfoglicéridos de colina, lo cual es característico de la membrana mielínica, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las biomembranas. Es de destacar que no se detectó cardiolipina (difosfatidil

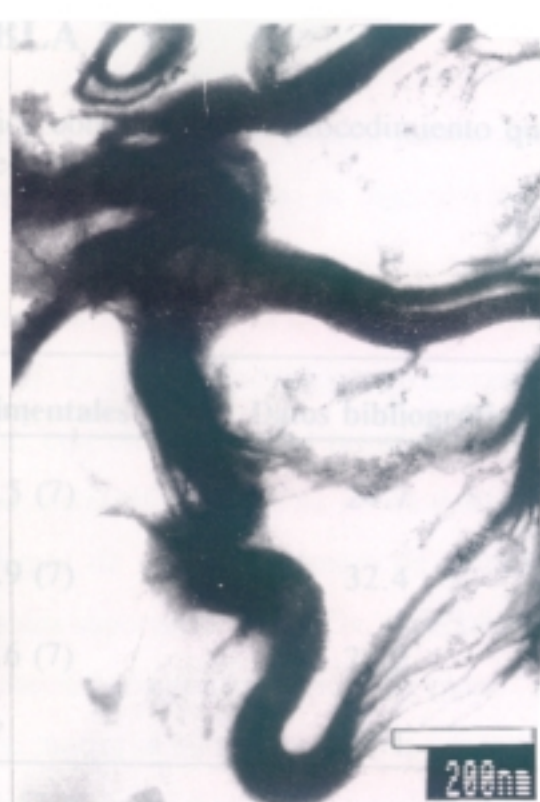
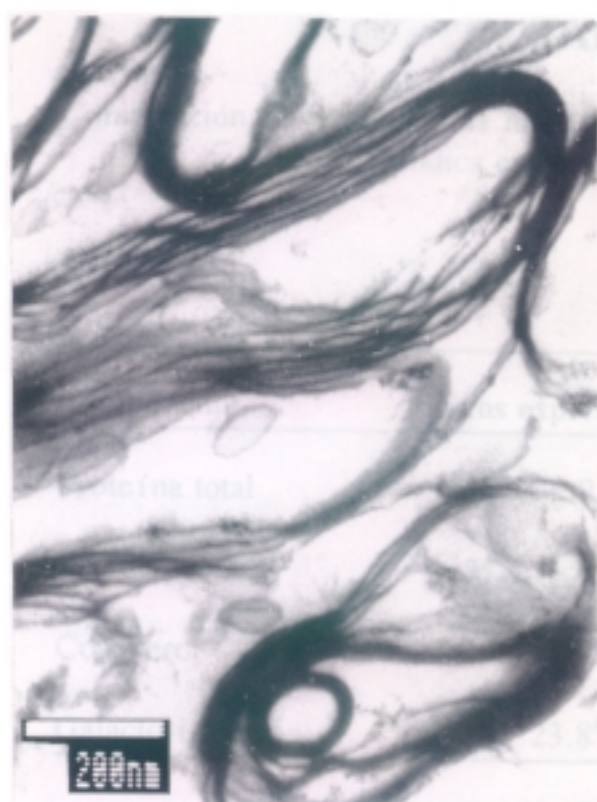


TABLA 3

Composición de la membrana mielínica obtenida por el procedimiento que se indica en Materiales y Métodos

Componente	Datos experimentales	Datos bibliográficos ^a
Proteína total	25.2 \pm 2.5 (7)	24.7
Fosfolípidos	31.1 \pm 2.9 (7)	32.4
Colesterol	19.9 \pm 2.6 (7)	21.2
Galactolípidos	23.8 ^b	22.1

Los resultados se expresan como el porcentaje en peso seco (g/100g de membrana liofilizada) \pm desviación estándar. Los números entre paréntesis se refiere al número de determinaciones sobre mielina procedente de diferentes purificaciones.

^aDatos recalculados a partir de los de Norton y Cammer, 1984 (18) para la mielina bovina de sistema nervioso central.

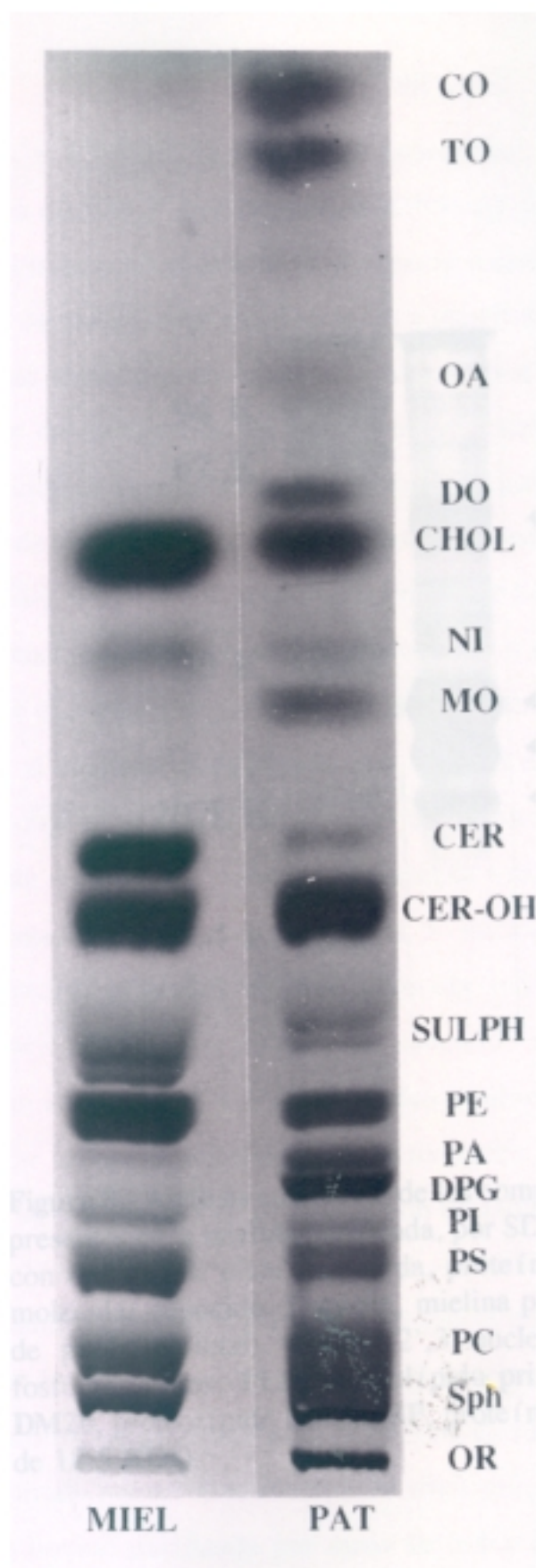
^bCalculado por diferencia (100 menos la suma de fosfolípidos, colesterol y proteína).

glicerol, DPG), un lípido específico de membrana mitocondrial. Con respecto a los lípidos neutros, únicamente fueron detectables pequeñísimas cantidades de ácidos grasos libres. No se detectaron ni monoglicéridos, ni diglicéridos, ni triglicéridos, ni ésteres de colesterol.

El análisis cualitativo de las proteínas presentes en la mielina purificada se llevó a cabo por SDS-PAGE (Figura 8). El patrón electroforético encontrado responde al descrito en la bibliografía, con cuatro bandas principales, PLP, DM20, proteína básica (BP) y CNPasa (ésta última resuelta en un doblete de pesos moleculares muy próximos), además de un buen número de proteínas minoritarias de pesos moleculares aparentes superiores a 30 KDa, detectables en gran medida gracias a la gran sensibilidad del reactivo revelador de plata.

A juzgar por los resultados que se muestran en la Figura 8, la proporción de DM20 es casi comparable a la del PLP en la mielina de cerebro bovino, confirmando resultados previos (Schindler et al., 1990 (19)), y en contra de la idea tradicional de que la DM20 es una isoforma minoritaria del PLP en la mielina del sistema nervioso central. Esta idea se fundamentó en el análisis cuantitativo de geles de electroforesis teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250. Sin embargo, se ha demostrado que la capacidad de tinción de DM20 con este reactivo es bastante inferior que la de PLP; además, la mayor hidrofobicidad de DM20 se traduce en una mayor propensión a la agregación e insolubilidad en los tampones de muestra para electroforesis, lo cuál puede conducir a subestimar la cantidad real de DM20 que existe en la membrana purificada. La preparación de muestras para la electroforesis detallada en la sección de Materiales y Métodos, junto al revelado con reactivo de plata solventan estos problemas.

La Tabla 4 resume los resultados de actividades enzimáticas llevados a cabo sobre la membrana purificada, conservada de dos maneras distintas: congelada con nitrógeno líquido y conservada a -80°C hasta su uso, o bien liofilizada y conservada a -30°C hasta su uso. Se escogieron cuatro enzimas



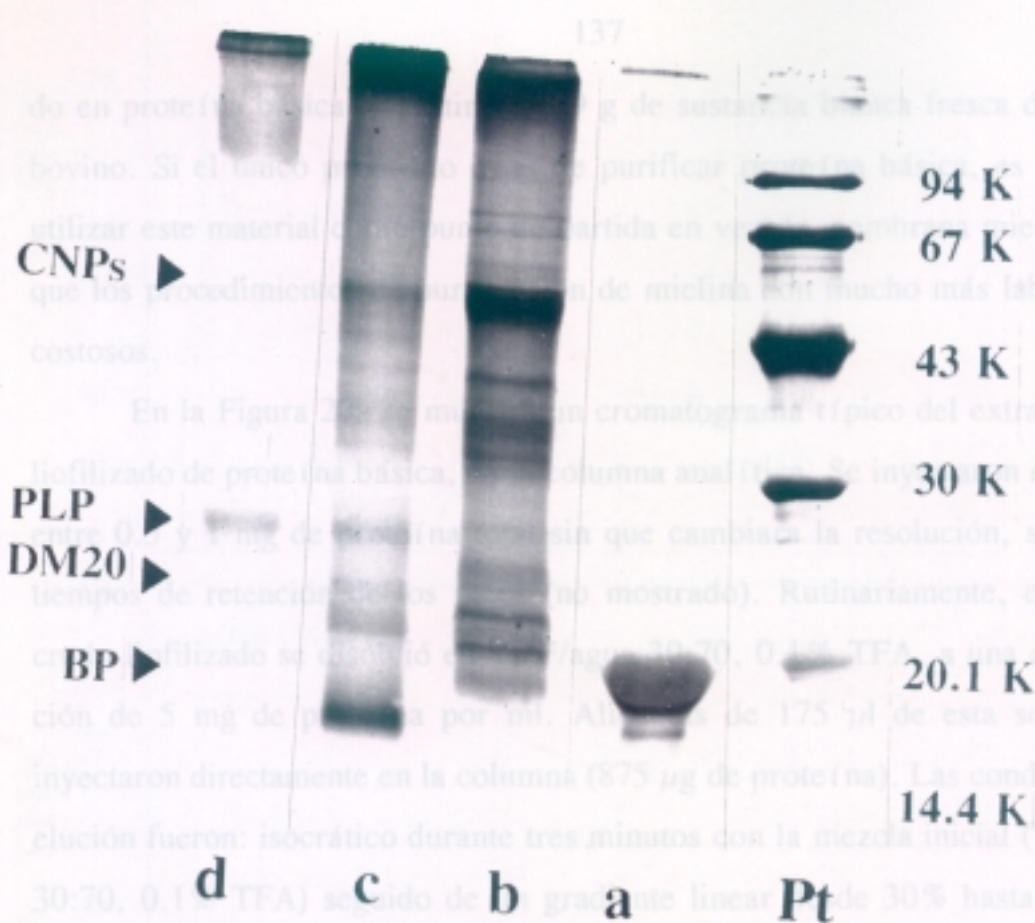


Figura 19.- Análisis por SDS-PAGE de las fracciones recolectadas en el cromatograma de la Figura 18. Pt, proteínas patrón de peso molecular conocido. Las calles marcadas con letras minúsculas se corresponden a las fracciones marcadas con la misma letra en el cromatograma de la Figura 18. Gel teñido con el reactivo de plata.

asociadas a mielina, una de ellas específica de esta membrana, la 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa). Los ensayos se llevaron a cabo homogeneizando las muestras en presencia o ausencia de detergente, porque la actividad de muchas enzimas asociadas a membrana requieren la presencia de un surfactante para su actividad máxima. En todos los casos, la actividad en presencia de detergente fue muy similar independientemente del estado de conservación de la membrana. Sin embargo, cuando el ensayo se llevó a cabo en ausencia de detergente, las actividades correspondientes a la membrana congelada fueron muy inferiores a las de la membrana liofilizada. Para ésta última, las actividades fueron muy parecidas en presencia o ausencia del detergente. Parece, pues, que el proceso de liofilización de la membrana facilita la exposición de las enzimas al sustrato, permitiendo que algunas enzimas con actividad "latente" actúen sobre el sustrato. En el caso de la membrana congelada, se requiere detergente para que la actividad enzimática total se manifieste. La excepción a lo comentado se da en el caso de la 5'-nucleotidasa, donde, en ausencia de detergente, la actividad es muy parecida independientemente del estado de conservación. Para esta enzima en concreto, se sabe que los detergentes no estimulan su actividad, e incluso pueden inhibirla (Cammer et al., 1980 (14)).

En términos absolutos, las actividades específicas de las enzimas en mielina bovina listadas en la Tabla 4 son bastante inferiores a las publicadas para mielina de cerebro de rata por Reiss et al., 1981 (15). El valor encontrado para el marcador específico CNPasa en presencia de detergente (9700 nmol/min/mg de proteína) es bastante inferior al encontrado por estos autores (48000 nmol/min/mg de proteína) para la mielina de rata, pero sin embargo es superior al encontrado por otros autores (3630 nmol/min/mg de proteína) para mielina de cerebro bovino purificada por otros métodos (Casadó et al., 1988 (20)). Con respecto a la anhidrasa carbónica, los resultados mostrados en la Tabla 4 concuerdan bien con las estimaciones de Cammer et al., 1977 (21) para la

TABLA 4

Actividades enzimáticas específicas en la mielina purificada y efecto de su estado de conservación

	CONGELADA	LIOFILIZADA
CNPasa		
sin OG	1900±400 (3)	7330±700 (3)
con OG	9200±900 (3)	9700±1400 (3)
5'-Nucleotidasa	16.5±2.1 (3)	14.6±3.0 (3)
Anh. carbónica		
sin Triton X-100	0.70±0.02 (5)	1.36±0.17 (5)
con Triton X-100	1.31±0.24 (5)	1.34±0.16 (5)
ATPasa total	38.4	60.0
Na/K-ATPasa	32.4	51.0
Mg-ATPasa	6.0	9.0
ATPasa total		
con 0.1% DOC	57.0	-
Na/K-ATPasa	48.6	-
Mg-ATPasa	8.4	-
ATPasa total		
sin NaN₃	34.8	69.6

Los resultados para la anhidrasa carbónica se expresan como unidades/mg de proteína, definidas como se indica en Materiales y Métodos. El resto de las actividades específicas se expresan como nmol Pi/min/mg de proteína. OG, octilglucósido; DOC, deoxicolato sódico.

mielina purificada de cerebro bovino, cuya actividad es muy inferior a la de la mielina de cerebro de rata o ratón. Lo mismo es aplicable al caso de la actividad ATPásica total si se comparan los resultados listados en la Tabla 4, para mielina bovina, con los de Reiss et al., 1981 (15) para mielina de rata. Sin embargo, desde el punto de vista cualitativo, en ambos casos la mayor parte de la actividad ATPásica total es inhibible por ouabaína (Na,K-ATPasa). Además, el hecho de que la actividad ATPásica total sea muy parecida en presencia o ausencia de azida sódica 4 mM indica que la enzima que se detecta en la mielina purificada no procede de contaminación por membranas mitocondriales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Norton W.T. y Poduslo S.E. (1973). *Myelination in rat brain: method of myelin isolation*. **J. Neurochem.** 21:749-757.
- 2.- Waehneldt T.V. y Mandel P. (1970). *Proteins of rat brain myelin. Extraction with sodium dodecylsulphate and electroforesis on analytical and preparative scale*. **FEBS Lett.** 9:209-212.
- 3.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. **J. Biol. Chem.** 193:265-275.
- 4.- Aguilar J.S., de Cózar M., Criado M. y Monreal J. (1982). *Method for lyophilizing brain proteolipid preparations that increases subsequent solubilization by detergents*. **J. Neurochem.** 39:1733-1736.
- 5.- Ames B.N. y Dubin D.T. (1960). *The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid*. **J. Biol. Chem.** 235:769-775.
- 6.- Autilio L.A. y Norton W.T. (1963). *Non-aqueous solvent extracts of lyophilized bovine brain white matter*. **J. Neurochem.** 10:733-738.
- 7.- Siedel J. Schlumberger H., Klose S., Ziegenhorn J. y Wahlefeld A.W. (1981). *Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol*. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** 19:838-839.
- 8.- Folch J., Lees M. y Sloane-Stanley G. (1957). *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. **J. Biol. Chem.** 226:497-509.
- 9.- Vitiello F. y Zanetta J.P. (1978). *Thin-layer chromatography of phospholipids*. **J. Chromatogr.** 166:637-640.
- 10.- Olsen R.E. y Henderson R.J. (1989). *The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 129:189-197.
- 11.- Laemmli U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. **Nature** 227:680-685.
- 12.- Prohaska J.R., Clark D.A. y Wells W.W. (1973). *Improved rapidity and precision in the determination of brain 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase*. **Analytical Biochemistry** 56:275-282.

- 13.- Rodríguez de Lores Arnáiz G., Antonelli de Gómez de Lima M. y Girardi E. (1988). *Different properties of two brain extracts separated in Sephadex G-50 that modify synaptosomal ATPase activities*. **Neurochem. Res.** 13:229-235.
- 14.- Cammer W., Sirota S.R., Zimmerman T.R. y Norton W.T. (1980). *5'-nucleotidase in rat brain myelin*. **J. Neurochem.** 35:367-373.
- 15.- Reiss D.S., Lees M.B. y Sapirstein V.S. (1981). *Is Na + K ATPase a myelin-associated enzyme?*. **J. Neurochem.** 36:1418-1426.
- 16.- Sapirstein V.S. y Lees M.B. (1978). *Purification of myelin carbonic anhydrase*. **J. Neurochem.** 31:505-511.
- 17.- Maren T.H. (1960). *A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors*. **J. Pharmac. Exp. Ther.** 130:26-29.
- 18.- Norton W.T. y Cammer W. (1984). *Isolation and characterization of myelin*. En (Morell P., ed.): **Myelin, 2nd Edition**. Plenum Press, Nueva York. Pp: 147-195.
- 19.- Schindler P., Luu B., Sorokine O., Trifilieff E. y Van Dorsselaer A. (1990). *Developmental study of proteolipids in bovine brain: a novel proteolipid and DM20 appear before proteolipid protein (PLP) during myelination*. **J. Neurochem.** 55:2079-2085.
- 20.- Casadó V., Mallol J. y Bozal J. (1988). *Isolation and characterization of bovine brain myelin distribution of 5'-nucleotidase*. **Neurochem. Res.** 13:349-357.
- 21.- Cammer W., Bieler L., Fredman T. y Norton W.T. (1977). *Quantitation of myelin carbonic anhydrase: Development and subfractionation of rat brain myelin and comparison with myelin from other species*. **Brain Res.** 138:17-28.

CAPITULO III

PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE MIELINA POR RP-HPLC

INTRODUCCION

El análisis y la purificación de las proteínas totales que componen la membrana mielínica ha estado obstaculizado durante años por sus particulares propiedades de solubilidad, especialmente en el caso de los proteolípidos, hasta tal punto de que no existe ningún procedimiento rápido y cuantitativo para la purificación de estas proteínas. Debido a su naturaleza hidrofóbica, su aislamiento se ha llevado a cabo generalmente en presencia de detergentes desnaturalizantes, sobre todo de dodecil sulfato sódico (SDS). Sólo después de la solubilización en SDS, las proteínas totales que forman parte de la membrana mielínica pudieron ser analizadas y purificadas por electroforesis preparativa en gel (Agrawal et al., 1977 (1)), o por cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión por tamaño (SE-HPLC) (Trotter y Wegescheide, 1985 (2)). La extracción con solventes orgánicos (González-Sastre, 1970 (3); Skolidis et al., 1986 (4)) permite el aislamiento de proteínas individuales de mielina, pero no es adecuada para la separación simultánea de todos los componentes proteicos de esta membrana.

Durante los últimos años, la técnica de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) ha experimentado un gran desarrollo en lo concerniente a la purificación de proteínas de membrana (Welling et al., 1987 (5); Shan et al., 1990 (6)). Esta técnica se basa en las interacciones hidrofóbicas que tienen lugar entre ligandos hidrofóbicos unidos a la fase estacionaria y los agrupamientos hidrofóbicos de las proteínas. La gran variedad de fases estacionarias disponibles en el mercado limitan el problema de la separación de las proteínas de mielina por RP-HPLC a la elección de una fase móvil apropiada. Esta, idealmente, debe reunir unas características físico-químicas adecuadas, tales como baja densidad y viscosidad (para evitar el uso de altas presiones), transparencia ultravioleta a 280 nm (para aumentar la sensibilidad en la detección de la proteína), y un alto poder eluotrópico que, en fase reversa,

es inversamente proporcional a su constante dieléctrica o polaridad. Esta última característica es muy importante cuando se trabaja con proteínas altamente hidrofóbicas, porque en caso contrario éstas pueden permanecer retenidas en la columna. Además es aconsejable que el solvente sea miscible con agua para la elución en gradiente. Muchos de los solventes orgánicos utilizados habitualmente en RP-HPLC satisfacen la mayor parte de las propiedades anteriores. Sin embargo, no cumplen uno de los requisitos fundamentales: no son capaces de disolver las proteínas totales de mielina, especialmente los proteolípidos. La baja solubilidad de la muestra en la fase móvil puede originar precipitaciones dentro de la columna provocando el colapso de la misma, y puede favorecer, especialmente en el caso de proteínas de membrana, la agregación y las interacciones inespecíficas de la muestra con la fase estacionaria, que se traduce en una recuperación baja y unos resultados no reproducibles (Josic et al., 1990 (7)).

Algunas de las proteínas menos hidrofóbicas de mielina, tales como la proteína básica o la glicoproteína asociada a mielina (MAG) se han conseguido purificar por RP-HPLC a partir de extractos crudos, utilizando solventes tradicionales en esta técnica, como las mezclas de acetonitrilo y agua (Giegerich et al., 1990 (8); Shimamura et al., 1990 (9)). Estas mezclas, sin embargo, son incapaces de disolver los componentes más hidrofóbicos, especialmente los proteolípidos. Recientemente, el n-propanol ha sido utilizado como modificador orgánico para la elución de las proteínas de mielina en RP-HPLC (Bizzozero et al., 1989 (10)). Sin embargo, la baja solubilidad de las proteínas en esta fase móvil alarga considerablemente la preparación de las muestras y reduce la vida útil de la columna.

A pesar de que la característica fundamental de los proteolípidos es la de su solubilidad en solventes orgánicos, sólo un número limitado de solventes o mezclas de los mismos se muestran efectivos en su solubilización o en su

extracción a partir de sustancia blanca de cerebro o de mielina purificada. A parte de la mezcla cloroformo/metanol 2:1 v/v (CM 2:1), el solvente tradicional de proteolípidos, éstos pueden disolverse en mezclas que contienen cantidades variables de cloroformo y metanol, o solventes relacionados, tales como las mezclas de cloruro de metileno o tetracloruro de carbono con metanol o etanol. Los proteolípidos de mielina también son solubles en solventes simples cuya estructura puede considerarse como una mezcla de hidrocarburos clorados y un alcohol, tales como el triclороetanol (Lees, 1965 (11)) o el 2-cloroetanol. Todos estos solventes, debido a sus propiedades físico-químicas, no son de uso general en RP-HPLC.

Así pues, el primero de los objetivos planteados en este capítulo fue el de encontrar un solvente o mezcla de solventes, compatibles con la tecnología de RP-HPLC, capaces de disolver las proteínas de mielina. Conseguido este propósito, se ha puesto a punto la metodología que permite la separación rápida de las tres fracciones proteicas principales de esta membrana a escalas analítica y semipreparativa.

MATERIALES Y METODOS

Solventes y reactivos químicos

Todos los solventes orgánicos empleados fueron de grado analítico o de grado HPLC. El tetrahidrofurano (THF) de grado HPLC se obtuvo de Probus y de Merck (Lichrosolv^R). El agua se obtuvo a partir de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore). El dodecil sulfato sódico (SDS), la acrilamida, la N,N'-metilén bisacrilamida, el persulfato amónico, la N,N,N',N'-tetrametiletilen diamina (TEMED), la glicina, el Tris, el ácido trifluoroacético y el Coomassie brilliant blue R-250 se compraron a Merck. Los reactivos para la tinción con plata de los geles de electroforesis se compraron como un Kit a los laboratorios Bio-Rad (*Silver Stain Plus*). El Sephadex LH-60 fue de Pharmacia.

Materiales biológicos

Los cerebros de vaca (aproximadamente un año de edad) se obtuvieron a partir de animales sacrificados en el momento en el matadero municipal de Madrid, y se transportaron hasta el laboratorio en baño de hielo. Se diseccionó la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales, se troceó y se lavó con solución de NaCl al 0.9%, y se utilizó inmediatamente para la purificación de membrana mielínica, o bien se conservó congelada a -30°C en atmósfera de nitrógeno, o se liofilizó y conservó a -30°C con gel de sílice como desecante y en atmósfera de nitrógeno.

La membrana mielínica se purificó a partir de sustancia blanca recientemente diseccionada y lavada, como se detalla en el capítulo II. La preparación final de mielina purificada se congeló con nitrógeno líquido y se conservó a -80°C , o se liofilizó y almacenó a -30°C con gel de sílice y atmósfera de nitrógeno.

La preparación proteolipídica utilizada en los ensayos de solubilidad se

obtuvo a partir de sustancia blanca por la modificación del método de Folch et al., 1957 (12), descrita por Monreal, 1975 (13), y se liofilizó según el método de Aguilar et al., 1982 (14). El liofilizado contiene un 30% de proteína y un 70% de lípidos. Su patrón electroforético está formado exclusivamente por los proteolípidos PLP y DM20, así como agregados proteolipídicos de alto peso molecular.

Los extractos crudos de proteína básica se prepararon de dos formas distintas:

a) A partir de la sustancia blanca de cerebro bovino, delipidada con CM 2:1, según el método de Oshiro y Eylar, 1970 (15).

b) A partir de mielina purificada, utilizando soluciones de CaCl_2 según el método de Gow y Smith, 1989 (16).

Los extractos se liofilizaron y se conservaron a -30°C . En algunos casos, se utilizó proteína básica purificada de conejo (18.5 KDa, Calbiochem), o proteína básica bovina purificada (Sigma).

La fracción Wolfgram se purificó a partir de membrana mielínica liofilizada según el método de Kurihara et al., 1971 (17).

Cálculo del índice de polaridad (P') en las mezclas de solventes

La polaridad de una mezcla binaria de solventes se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$P' = aP_a + bP_b$$

donde P' es el índice de polaridad de la mezcla final, a y b son las fracciones de volumen de los solventes individuales y P_a y P_b sus respectivos índices de polaridad. La fórmula anterior y el valor de los índices de polaridad de cada uno de los solventes se tomaron de Snyder, 1974 (18).

Ensayos de solubilidad

Un mililitro de cada una de las mezclas ensayadas de THF y agua se añadieron sobre las siguientes cantidades de material biológico, contenido en tubos pequeños de vidrio: 6 mg de preparación proteolipídica liofilizada (1.8 mg de proteína); 6 mg de mielina liofilizada (1.73 mg de proteína); 64 mg de mielina fresca (1.73 mg de proteína), o 68 mg de sustancia blanca fresca (5.5 mg de proteína). Los tubos taparon, se agitaron en un *vortex* y se centrifugaron a 100.000 g durante 30 minutos. De cada sobrenadante se tomaron alícuotas para la determinación de proteína. Los resultados se expresan como el porcentaje de proteína solubilizada con respecto a la proteína total de la muestra correspondiente.

La solubilidad del preparado proteolipídico liofilizado en mezclas de THF y agua se investigó también tras su solubilización previa en la mezcla cloroformo/metanol 2:1 v/v (CM 2:1). Para ello se preparó una solución stock de crudo proteolipídico liofilizado en CM 2:1 (50 mg de liofilizado por ml). A partir de esta solución se pipetearon alícuotas de 120 μ l (1.8 mg de proteína) en tubos de vidrio. Se evaporó el solvente con una corriente de nitrógeno, y los residuos se trataron con un mililitro de la mezcla de THF y agua correspondiente, como se describe arriba.

Electroforesis

Preparación de las muestras

Los extractos obtenidos con las mezclas de THF y agua en los ensayos de solubilidad, y las fracciones obtenidas por RP-HPLC se liofilizaron directamente. Los liofilizados obtenidos, así como los materiales biológicos de partida (mielina, sustancia blanca, crudo proteolipídico) se procesaron para electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de dos maneras distintas:

a) Delipidando con THF anhidro, y disolviendo el residuo proteico delipidado en el tampón de muestra para la electroforesis (Tris-HCl 0.25 M, pH 6.8, conteniendo 2.5% de SDS), con la ayuda de un sonicador de baño (Bransonic 12).

b) Disolviendo las muestras, con o sin lípidos, en solución de Na_2CO_3 al 1% conteniendo SDS al 2.5%, sonicando cuando fue preciso. Este medio fue particularmente útil para disolver las fracciones liofilizadas obtenidas por RP-HPLC. Antes de la electroforesis, las proteínas disueltas se transfirieron al tampón de muestra para la electroforesis (Tris-HCl 0.25 M, pH 6.8, conteniendo un 2.5% de SDS) utilizando minicolumnas rellenas con Sephadex G-25, como se describió en el capítulo II (ver Pag. 84).

Condiciones de la electroforesis y métodos de tinción

Se prepararon geles (7 x 8 cm, 0.75 mm de grosor) de acrilamida a una concentración del 14%, con un gel concentrador (*stacking*) de acrilamida al 3%. Las condiciones de SDS-PAGE fueron las descritas por Laemmli (1970 (19)). El buffer de desarrollo fue 0.05 M Tris, 0.384 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.4. Se utilizó una unidad vertical *Mighty Small II* (Hoeffer Scientific Instruments), conectada a una fuente de alimentación LKB 2103. La intensidad de corriente eléctrica fue de 3 mA, y el tiempo de desarrollo fue de unos 40-60 minutos. La cantidad de muestra en cada calle fue de 1-30 μg de proteína, en un volumen de 5-15 μl , y llevaron un 10% de glicerol y 10 $\mu\text{g/ml}$ de azul de bromofenol. Completado el desarrollo, los geles se tiñieron de dos formas distintas:

a) Con Coomassie Brilliant Blue R-250: Los geles se tiñeron toda la noche en una solución del colorante al 0.25% en metanol/agua/ácido acético glacial 45:45:5, en volumen, y se destiñeron con metanol/agua/ácido acético glacial 27:64:9, en volumen, hasta que el el contraste entre las bandas y el fondo fue suficientemente alto.

b) Con la tinción de plata: se usó el método de Gottlieb et al., 1987 (20), utilizando el kit de los laboratorios Bio-Rad (*Silver Stain Plus*). Los geles se mantuvieron en la solución reveladora durante unos 15 minutos.

Análisis densitométrico de los geles de electroforesis

Los geles teñidos se analizaron en un densitómetro láser (Molecular Dynamics 300A Computing Laser Densitometer). Los pesos moleculares de las bandas se calcularon utilizando el *software* incorporado al ordenador conectado al aparato, por comparación con la movilidad de proteínas de referencia de peso molecular conocido: Fosforilasa b (94 KDa), seroalbúmina bovina (67 KDa), ovoalbúmina (43 KDa), anhidrasa carbónica (30 KDa), inhibidor de tripsina de soja (20.1 KDa) y alfa-lactalbúmina (14.4 KDa), todas ellas obtenidas como un kit de Pharmacia (Suecia).

Cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPLTC)

La composición lipídica cualitativa de las muestras se examinó sobre placas de HPTLC de 10 x 10 cm o de 10 x 20 cm precubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck). Las muestras, disueltas en CM 2:1 se aplicaron como bandas de 1 cm de ancho, a 1.5 cm del extremo inferior de la placa, usando una jeringa Hamilton. Las placas se desarrollaron por el método descrito por Vitiello y Zanetta, 1978 (21), y se revelaron exponiéndolas a vapores de yodo.

Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC)

Preparación de las muestras

Antes de inyectar en la columna, la membrana mielínica purificada y liofilizada se delipidó de dos formas distintas:

a) Con Sephadex LH-60: se disolvió la mielina liofilizada en la mezcla THF/agua 4:1 v/v, conteniendo un 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA), a una

concentración de 2 mg de proteína por ml, y se filtró a través de una columna de 5 ml rellena con Sephadex LH-60 (Bizzozero et al., 1982 (22)), equilibrada y eluida con la misma mezcla. Las proteínas delipidadas eluyen en el volumen vacío de la columna (V_0).

b) Con THF anhidro: 50 mg de mielina liofilizada se trataron con 8 ml de THF (grado HPLC) en tubos de vidrio con tapón de rosca. Se agitó con un agitador de tubos tipo *vortex* y se centrifugó a máxima velocidad en centrífuga de mesa durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante, y sobre el precipitado se repitió el mismo tratamiento otras cinco veces. El precipitado final se disolvió en THF/agua 4:1, 0.1% TFA a una concentración de 3.5 mg de proteína por ml. Este procedimiento produce una delipidación del 95%, con una recuperación de proteína en torno al 88%.

Antes de inyectar, la mielina delipidada, disuelta en THF/agua 4:1 v/v, 0.1% TFA, se diluyó con agua conteniendo 0.1% de TFA hasta que la concentración final de THF en la muestra fue del 30% en volumen. Todas las muestras se filtraron a través de filtros FHLF de 0.5 μm (Millipore), o se centrifugaron en una centrífuga para tubos Eppendorff a máxima velocidad durante 15 minutos antes de ser inyectadas.

Equipamiento, columnas y condiciones de elución

Se utilizó un sistema de HPLC de Perkin-Elmer equipado con dos bombas y un formador de gradientes, conectado a un detector ultravioleta LC-75 de longitud de onda variable y a una estación de datos modelo 3600 (Perkin-Elmer). Se utilizaron las columnas Altex RPSC Ultrapore C-3 (tamaño de poro de 300 Å; tamaño de partícula de 5 μm) analítica (4.6 mm x 7.5 cm) y semipreparativa (10 mm x 25 cm), suministradas por Beckman. Para la columna analítica se incorporó al inyector un *loop* de 500 μl ; para la columna semipreparativa se utilizó un *loop* de 4.8 ml. La elución se llevó a cabo a temperatura ambiente (23-

26 °C), con detección ultravioleta a 280 nm. El flujo fue de 1 ml/min para la columna analítica y de 4.7 ml/min para la columna semipreparativa.

Determinaciones analíticas

La proteína se determinó por el método de Lowry et al., 1951 (23), incorporando un 3% de SDS al reactivo C (Aguilar et al., 1982 (14)), y usando seroalbúmina bovina como patrón. El fósforo lipídico se determinó por el método de Ames y Dubin (1960 (24)).

RESULTADOS

Solubilidad de los proteolípidos en solventes orgánicos

Como estudio previo, se ensayó la solubilidad de los proteolípidos purificados y liofilizados en más de 130 mezclas de solventes orgánicos, de los cuáles los más representativos se muestran en la tabla 5. Como criterio comparativo, se escogió el índice de polaridad (P') propuesto por Snyder, 1974 (18). En HPLC de fase reversa, el valor de P' para un solvente es inversamente proporcional a su poder eluotrópico: solventes con bajo índice de polaridad son los que poseen mayor capacidad de elución de solutos.

Desde el punto de vista de la solubilización de un determinado soluto por un solvente, es útil distinguir entre la "fuerza" del solvente, cuantificada mediante P' , y su selectividad, que podría definirse como la capacidad que tiene un solvente para exhibir interacciones específicas con un soluto, y que otros solventes con la misma polaridad (P') no poseen. La selectividad de los solventes se cuantifica mediante tres parámetros, x_e , x_d y x_n que, desde el punto de vista práctico, reflejan la capacidad relativa de un solvente para funcionar, respectivamente, como aceptor de protones, dador de protones, o participar en interacciones dipolo-dipolo. De acuerdo al valor de cada uno de estos tres parámetros, Snyder (1974 (18)) clasifica a los solventes en nueve grupos de selectividad diferentes. Por ejemplo, los solventes incluidos en el grupo I (éteres, aminas y guanidinas sustituidas) son fuertes aceptores de protones (x_e alto), dadores débiles de protones (x_d bajo) y poseen un momento dipolar intermedio (x_n). El grupo II está constituido por solventes con capacidad aceptora y dadora de protones (alcoholes alifáticos). Otros alcoholes más acídicos (glicoles, alcohol bencílico) se incluyen en el grupo IV. El grupo VIII engloba los solventes con gran capacidad dadora de protones, tales como el cloroformo y el agua.

En la práctica, éste autor recomienda como el primer paso para investigar

TABLA 5

Solubilidad de la fracción proteolipídica liofilizada en solventes orgánicos.

Mezcla	Polaridad (P')	Grupo de Selectividad	Solubilidad
CM 2:1	5.13	II	+++
n-propanol/agua 76:24	5.13	VIII	-
n-propanol/agua 76:24 0.1 % TFA	5.13	VIII	-
isopropanol/agua 79:21	5.13	VIII	-
n-propanol/metanol 54:46	5.13	II	-
n-butanol/metanol 55:45	5.13	II	-
THF/metanol 61:39	5.13	II	-
THF/agua 80:20	5.16	VIII	+++
THF	4.20	III	-
THF/etilenglicol 73:27	4.53	IV	+++
THF/etilenglicol/agua 76:14:10	4.84	VIII	+++
THF/etilenglicol/metanol 59:27:14	4.84	II	+
diclorometano/metanol 2:1	NI	II	+++
1,2-dicloroetano/metanol 2:1	NI	II	+++
2-cloroetano	NI	NI	+++
acetonitrilo	6.20	Vla	-
acetonitrilo/agua 75:25	6.90	VIII	-
0.1 % TFA			
acetonitrilo/agua 50:50	7.60	VIII	-
0.1 % TFA			
acetonitrilo/agua 25:75	8.30	VIII	-
0.1 % TFA			

Se trataron 10 mg de PLP liofilizado (3 mg de proteína) con un mililitro de las mezclas que se indican. Después de agitar en vortex, se asignaron las siguientes unidades arbitrarias de solubilidad: (-), partículas suspendidas, sin aparente solubilización; (+), fuerte turbidez sin partículas suspendidas visibles; (++), turbidez ligera; (+++), solución transparente, sin ninguna partícula suspendida. El ácido trifluoroacético (TFA) no se tuvo en cuenta para el cálculo del índice de polaridad en las mezclas que lo contienen. Las proporciones de los solventes en las mezclas se expresan en volumen. NI, no indicado. En las mezclas, se seleccionó el grupo de selectividad del componente más polar (Snyder, 1974 (18)).

la solubilización completa de un soluto, el encontrar la polaridad óptima utilizando una mezcla de dos solventes con distinta P' . Tras ello, la selectividad más adecuada puede determinarse utilizando una mezcla con el óptimo valor de P' , pero perteneciendo a otros grupos de selectividad. Puesto que los proteolípidos se han disuelto y extraído tradicionalmente con la mezcla CM 2:1 ($P' = 5.13$), se ensayaron varias mezclas con idéntica polaridad y ampliamente utilizadas en la técnica de RP-HPLC (Tabla 5). Las mezclas de n-propanol, isopropanol o n-butanol con agua o metanol fueron ineficaces, incluso cuando se incluyó ácido (0.1% TFA). Lo mismo ocurrió con las mezclas de THF y metanol. Sin embargo, el THF mezclado con agua en la proporción 80:20 v/v, con una polaridad prácticamente idéntica a la del CM 2:1, disolvió por completo la muestra. Lo mismo ocurrió con otras mezclas binarias y ternarias que incluyen el THF, a pesar de que su P' es muy distinto de 5.13. Tal es el caso de THF/etilenglicol 73:27 ó THF/etilenglicol/agua 76:14:10 (por volumen). Las mezclas de acetonitrilo y agua, quizás la fase móvil más utilizada en RP-HPLC, fueron ineficaces, incluso conteniendo 0.1% de TFA.

Los resultados recogidos en la Tabla 5 indican que, además de las mezclas ya descritas en la literatura (CM 2:1, 2-cloroetanol, diclorometano/metanol 2:1, dicloroetano/metanol 2:1), sólo algunas mezclas en las que participa el THF son capaces de disolver completamente a los proteolípidos purificados. Entre ellas, las mezclas de THF y agua parecen *a priori* las más adecuadas como fase móvil para RP-HPLC, por lo que se investigaron con detalle.

Solubilidad de los proteolípidos en mezclas de THF y agua

Los proteolípidos pueden disolverse en mezclas que contienen diferentes proporciones de THF y agua. La Figura 9 muestra el rango dentro del cuál el PLP liofilizado fue soluble. Tanto el THF puro como la mezcla que contiene un 50% de agua disuelven cantidades mínimas de proteína. Por el contrario, las

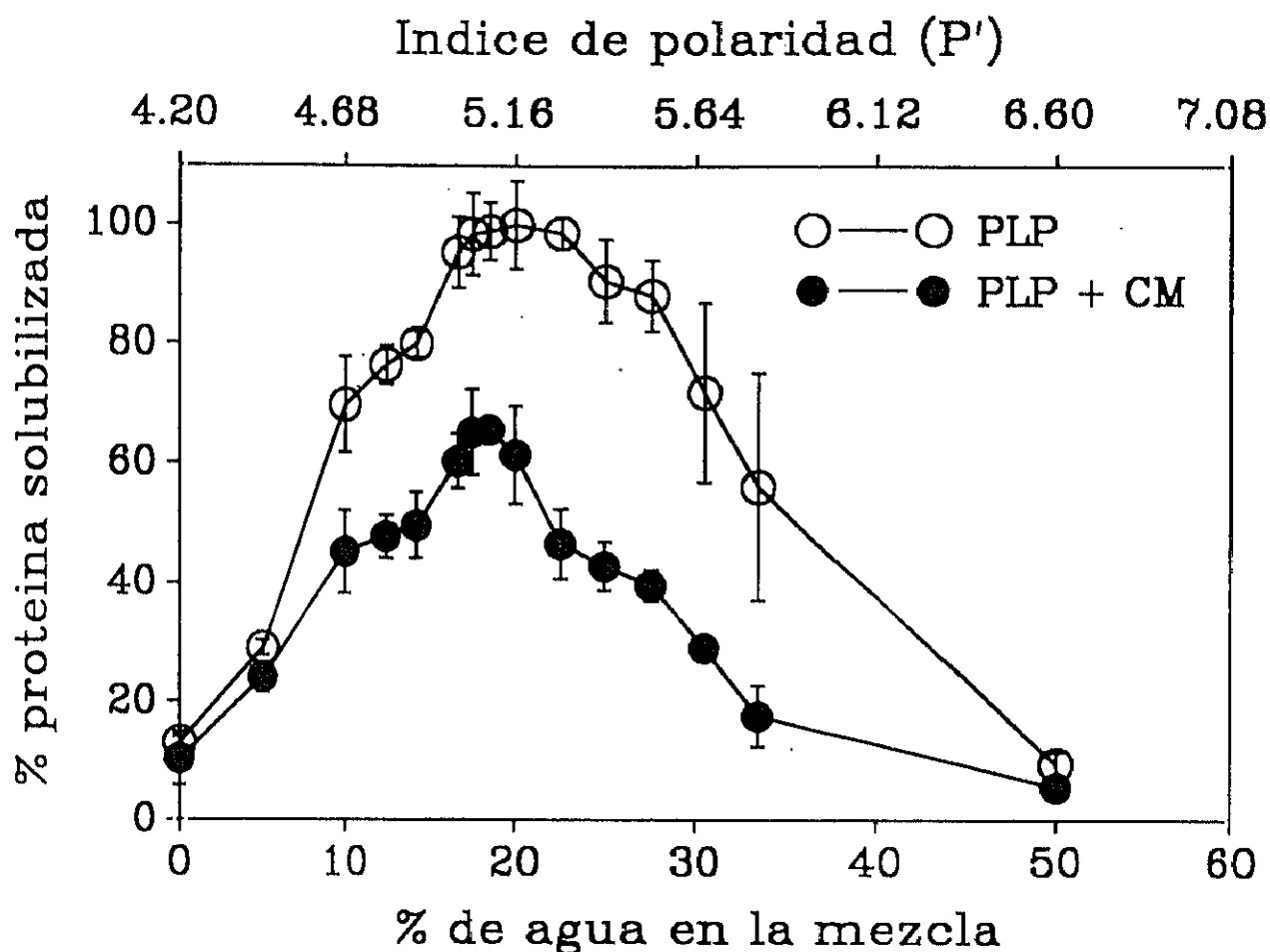


Figura 9.- Solubilidad de los proteolípidos de mielina en mezclas de THF y agua. Símbolos blancos: seis mg de un extracto proteolipídico liofilizado (1.8 mg de proteína) se trataron con 1 ml de la mezcla correspondiente. Tras agitar y centrifugar, se determinó la cantidad de proteína solubilizada en alícuotas tomadas de los sobrenadantes. Símbolos negros: alícuotas de 120 μ l de una solución 50 mg/ml del extracto proteolipídico liofilizado en CM 2:1 (1.8 mg de proteína) se pipetearon en tubos de vidrio. Tras evaporar los solventes con una corriente de nitrógeno, los residuos se trataron con 1 ml de la mezcla de THF y agua correspondiente. Tras agitar y centrifugar, se determinó la proteína solubilizada en alícuotas de los sobrenadantes. Los resultados se expresan como el tanto por ciento de proteína solubilizada en función del contenido en agua de la mezcla (en volumen), o su índice de polaridad correspondiente. Cada punto representa la media de tres experimentos diferentes. Las barras verticales representan la desviación estándar.

mezclas que contienen entre un 17% y un 23% de agua disuelven la preparación proteolípida completamente; si la cantidad de agua es mayor del 23% o menor del 17%, la solubilidad disminuye marcadamente.

Cuando la muestra de proteolípidos se disolvió previamente en CM 2:1, se evaporó el solvente con una corriente de nitrógeno, y los residuos se trataron con las mezclas de THF y agua (Figura 9, símbolos negros), la cantidad de proteína disuelta disminuyó marcadamente (la solubilidad máxima fue en torno al 65%). Esta pérdida de solubilidad es atribuible a la exposición de los proteolípidos a altas concentraciones de metanol, menos volátil que el cloroformo durante el proceso de evaporación. La pérdida de solubilidad de los proteolípidos ("desnaturalización") inducida por metanol es un proceso conocido desde hace tiempo (Folch-Pi y Stoffyn, 1972 (25)). Sin embargo, a pesar de la pérdida cuantitativa de solubilidad, el perfil de la curva de solubilización es muy similar a la curva control (Figura 9, símbolos blancos). El porcentaje máximo de solubilización corresponde también a la mezcla que contiene aproximadamente un 20% de agua en volumen.

Solubilidad de las proteínas de mielina en mezclas de THF/agua

La proporción de proteínas totales de mielina que se disuelven en las muestras de THF y agua se muestran en la Figura 10a. El perfil de solubilización fue muy similar para las dos preparaciones de mielina utilizadas, liofilizada o fresca; el hecho de que las dos curvas no solapen perfectamente se debe, sin duda, al agua aportada por el material fresco (alrededor de un 5% adicional en las condiciones del ensayo), y que no fue tenido en cuenta en los cálculos de índices de polaridad. Las mezclas conteniendo entre un 20 y un 33% de agua (mielina liofilizada) o entre un 17 y un 30% de agua (mielina fresca), disolvieron la cantidad máxima de proteína, cifrada en torno al 60% de la proteína total de la mielina. Los extractos obtenidos a partir de mielina liofilizada con cada una

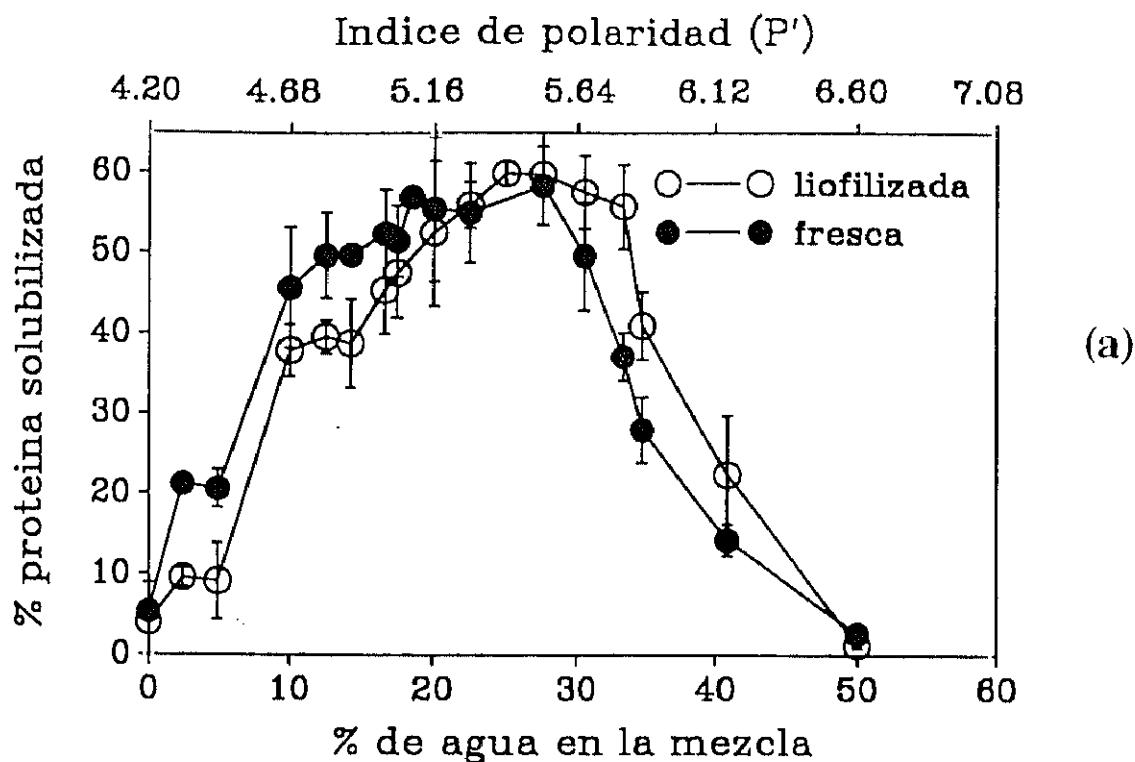
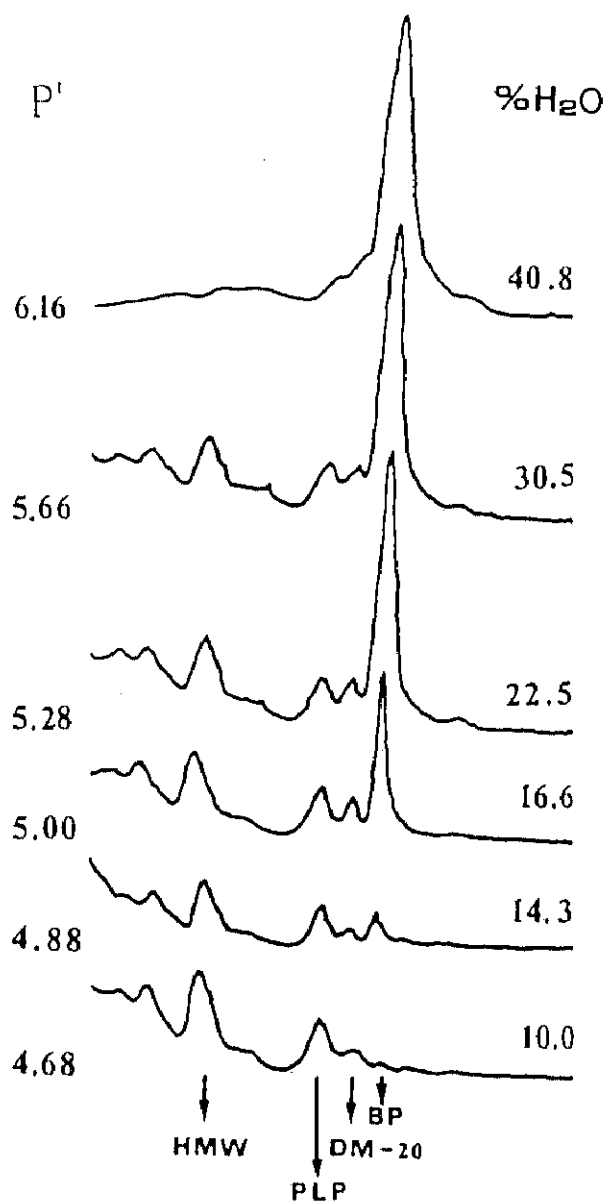


Figura 10.- Solubilidad de las proteínas de mielina en mezclas de THF y agua. (a), muestras de mielina liofilizada (símbolos blancos) o de mielina fresca (símbolos negros), ambas conteniendo idéntica cantidad de proteína total (1.73 mg) se trataron con 1 ml de la mezcla correspondiente. Tras agitar y centrifugar, se determinó la proteína solubilizada en los sobrenadantes. Cada punto representa la media de tres experimentos diferentes. Las barras verticales indican la desviación estándar. (b), perfiles densitométricos de los extractos obtenidos a partir de mielina fresca con THF y agua, tras la SDS-PAGE y la tinción con Coomassie.



de las mezclas ensayadas se sometieron a SDS-PAGE como se indica en Materiales y Métodos. Los geles, teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 se analizaron por densitometría láser. Los perfiles densitométricos se muestran en la Figura 10b. A una polaridad baja ($P' = 4.68$), con la mezcla que contiene un 10% de agua en volumen, los proteolípidos fueron las principales especies proteicas extraídas. Son visibles, además, otras bandas difusas de alto peso molecular correspondientes a los agregados proteolipídicos que muy a menudo se observan en la electroforesis de proteolípidos (Lees y Brostoff, 1984 (26)). A polaridades mayores, las dos bandas de proteolípidos (PLP y DM-20) y sus agregados también están presentes, pero la cantidad de proteína básica extraída va aumentando gradualmente. La mezcla conteniendo un 40.8% de agua ($P' = 6.16$) extrajo casi exclusivamente proteína básica. Así, variando únicamente la cantidad de agua presente en la mezcla pueden prepararse extractos altamente enriquecidos en proteolípidos o en proteína básica a partir de membrana mielínica purificada.

Es de destacar que la solubilidad de las proteínas de mielina fue total (100%) cuando se incluyó ácido (0.1% de TFA) en la mezcla con un 20% de agua (THF/agua 4:1 v/v). Como se ve en la Figura 10a, la proteína extraída con esta mezcla en ausencia de ácido es de alrededor de un 60%. La presencia del ácido facilita la solubilización de las proteínas de la fracción Wolfgram, que son, por definición, aquellas proteínas de mielina insolubles en CM 2:1, pero solubles en CM 2:1 acidificado.

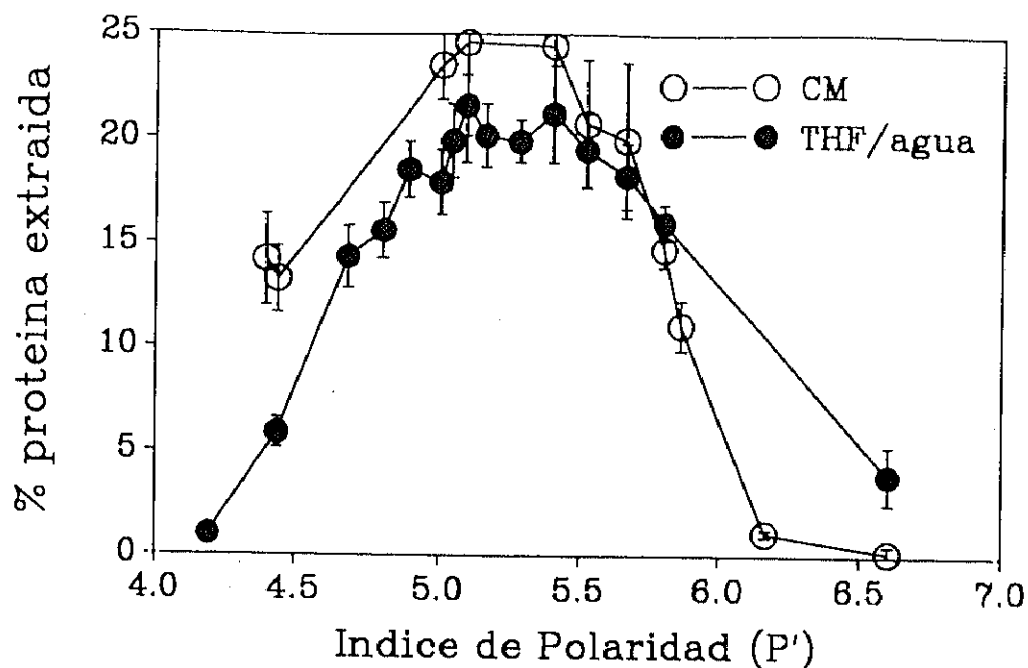
Extracción de la sustancia blanca de cerebro con mezclas de THF y agua. Efecto de la composición del solvente.

La proporción de proteínas extraídas a partir de sustancia blanca fresca de cerebro por mezclas de THF y agua, desde 0% hasta 50% de agua, se muestra en la Figura 11a (símbolos negros). La cantidad máxima de proteína extraída

se cifra en torno al 20% de la proteína total, y se alcanza dentro de un intervalo relativamente estrecho de polaridades (P' entre 5.09 y 5.40). La proporción de proteínas extraídas por mezclas de cloroformo y metanol (entre 0% y 100% de metanol) también se indican en la Figura 11a (símbolos blancos). Para que los resultados obtenidos con los dos sistemas de solventes fueran comparativos, los valores experimentales se han representado en función de sus índices de polaridad respectivos. Las mezclas de cloroformo y metanol extrajeron alrededor del 25% de la proteína total, en un intervalo similar de polaridades (entre 4.68 y 5.40) que el de las mezclas de THF y agua. El cloroformo puro extrajo un 14% de la proteína total, mientras que el THF puro extrajo únicamente el 1% utilizando tejido fresco.

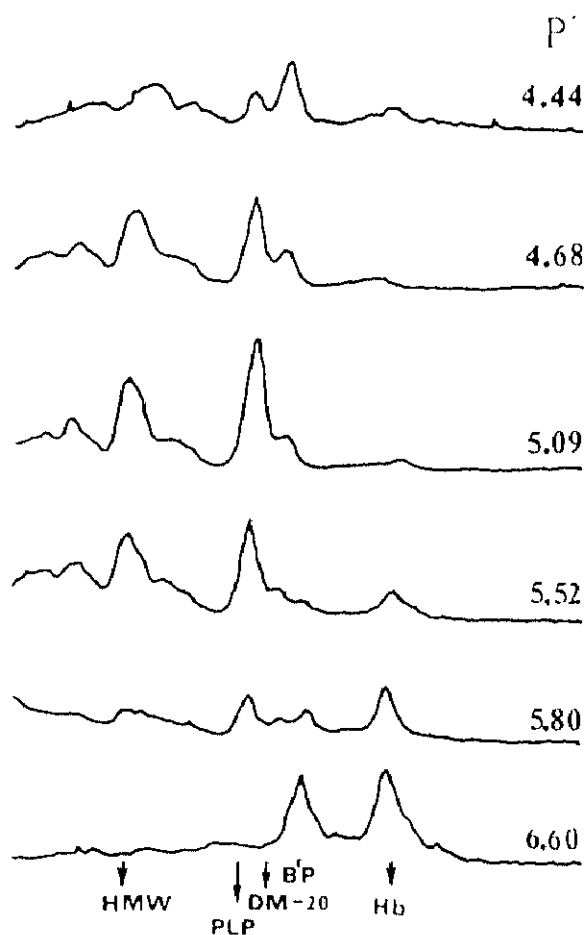
En la Figura 11b se muestran los densitogramas de los extractos obtenidos con las mezclas de THF y agua después de la electroforesis. Nuevamente, la cantidad y el tipo de las proteínas extraídas dependen marcadamente de la polaridad de la mezcla extractora. A la polaridad más baja analizada ($P' = 4.44$; 5% de agua), el proteolípido DM-20 se extrajo preferentemente; a polaridades intermedias (4.68 y 5.09; 10% y 18.5% de agua, respectivamente) la relación PLP/DM20 aumenta gradualmente. Con estas últimas mezclas, las especies predominantemente extraídas son los proteolípidos y sus agregados. Las mezclas con mayor contenido en agua extrajeron menor cantidad de proteolípidos y mayor cantidad de proteína básica. La mezcla que contiene un 50% de agua ($P' = 6.60$) extrajo exclusivamente proteína básica y una proteína no identificada con un peso molecular aparente de 16 KDa, probablemente restos de hemoglobina.

La composición lipídica de los extractos obtenidos con las mezclas de THF y agua se analizó por HPTLC (resultados no mostrados). Al contrario de lo observado con las proteínas, no se encontraron grandes diferencias cualitativas en la composición lipídica de los extractos, dentro del rango de polaridades



(a)

Figura 11.- Extracción de las proteínas de sustancia blanca con mezclas de THF y agua. (a), se trataron 68 mg de sustancia blanca fresca, homogeneizada (5.5 mg de proteína total), con 1 ml de diferentes mezclas de THF y agua (símbolos negros), o de cloroformo y metanol (símbolos blancos), ambas cubriendo un rango semejante de índices de polaridad (P'). Tras agitar y centrifugar, se determinó la proteína extraída en los sobrenadantes. Cada punto representa la media de tres diferentes experimentos. Las barras verticales indican la desviación estándar. (b), perfiles densitométricos de los extractos obtenidos con las diferentes mezclas de THF y agua, tras la SDS-PAGE y la tinción con Coomassie.



(b)

estudiado. Las especies detectadas para todos ellos fueron: colesterol, cerebrósidos (dos manchas), sulfátidos (dos manchas), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (Sph). La mancha en el origen fue apreciablemente más intensa con las mezclas que extrajeron la máxima cantidad de proteína.

Purificación de las proteínas de mielina por RP-HPLC a escala analítica

En primer término se abordó el problema de la selección de la fase estacionaria adecuada. El desarrollo de los nuevos soportes de gel de sílice unido a cadenas alquilo cortas o ultracortas, y de tamaño de poro ancho, han sido especialmente útiles para la separación de otras proteínas hidrofóbicas. Entre ellas, los mejores resultados se consiguieron, para los propósitos de este capítulo, con columnas C3 de 300 Å de tamaño de poro, en coincidencia con resultados previos de otros autores (Nice et al., 1981 (27)). En estudios preliminares se ensayaron columnas C6 y C18 sin éxito, debido a la total retención de algunas proteínas, principalmente los proteolípidos.

Las condiciones óptimas de separación de las proteínas de mielina se investigaron en primer lugar con cada uno de los componentes por separado (proteína básica, proteínas de la fracción Wolfgram y proteolípidos), extraídos a partir de mielina o de sustancia blanca. Se comenzó con el componente menos hidrofóbico, la proteína básica, y la columna C3 analítica. Uno de los parámetros investigados en primer término fue el contenido inicial de THF en la fase móvil. Este debe de ser suficientemente alto para mantener en solución a las proteínas más hidrofóbicas (proteolípidos), y al mismo tiempo suficientemente bajo para permitir que las proteínas más hidrofílicas (proteína básica) interactúen con la columna y no salgan excluidas en el V_0 (el frente del solvente). La Figura 12 muestra la posición de elución de la proteína básica de conejo comercial (Calbiochem, 18.5 KDa) bajo distintas condiciones de

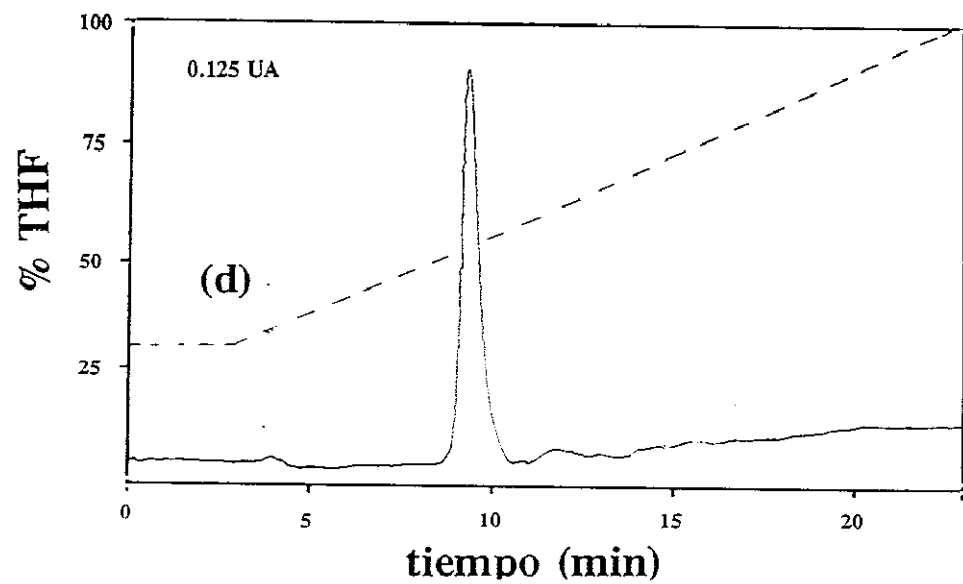
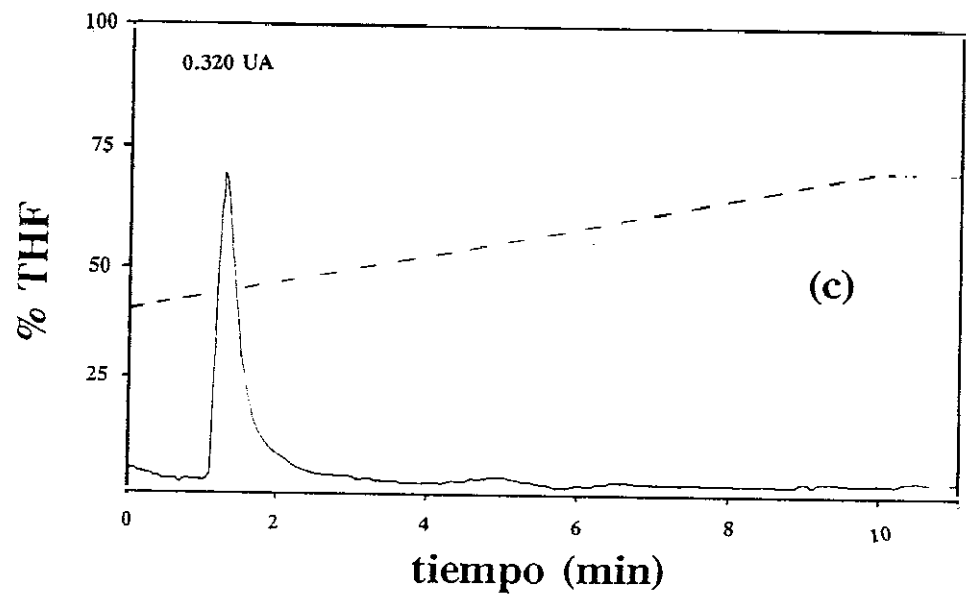
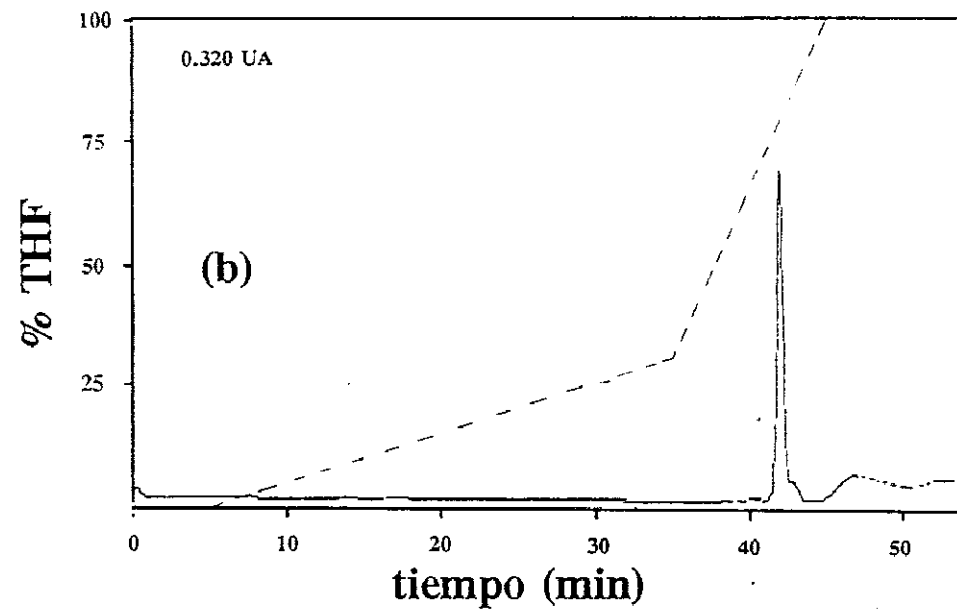
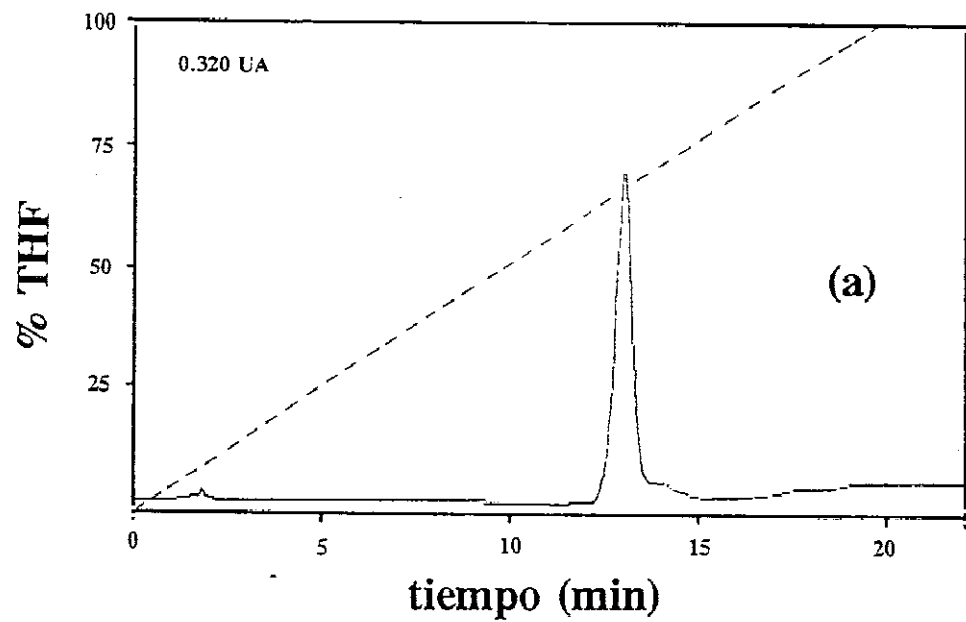
gradiente. Como la proteína básica es hidrosoluble, se ensayaron dos gradientes diferentes, comenzando por TFA al 0.1 % en agua (0 % THF; Figuras 12a y 12b). Estas condiciones iniciales son, sin embargo, impracticables en el caso de los proteolípidos debido a su insolubilidad en agua, por lo que se aumentó la concentración inicial de THF. Se encontró que la concentración máxima de THF que permite que la proteína básica interactúe con la columna es del 30 % (Figura 12d). Una concentración inicial del 40 % (Figura 12c) o incluso del 35 % evita la interacción de la proteína básica con la fase estacionaria, y la excluye junto al frente del solvente.

Conocida la concentración inicial de THF óptima en el gradiente, se purificaron cada una de las fracciones proteicas de mielina (proteínas básicas, fracción de proteínas Wolfgram y proteolípidos), y se inyectaron por separado bajo las mismas condiciones de elución: tres minutos en condiciones isocráticas con 30 % de THF en agua, seguido de un gradiente lineal de 20 minutos desde 30 % hasta 100 % de THF en agua (Figura 13). Las dos soluciones (agua y THF) contuvieron un 0.1 % en volumen de TFA.

La proteína básica, aislada con una solución de CaCl_2 a partir de membrana mielínica purificada como se describe en Materiales y Métodos, eluye a un tiempo de retención idéntico (Figura 13a) al de la proteína básica comercial de conejo bajo las mismas condiciones de elución (Figura 12d), y a un porcentaje de THF del 54 %. Las proteínas de mielina insolubles en CM 2:1 (fracción Wolfgram, Figura 13b) eluyen a unos porcentajes de THF algo mayores, en torno al 70 % para el pico principal. En esta preparación se detectan pequeñas cantidades de proteína básica (pico a los 10 min) y proteolípidos contaminantes. Los proteolípidos, extraídos a partir de sustancia blanca de cerebro bovino y delipidados a través de Sephadex LH-60 como se describe en Materiales y Métodos, eluyen a un 84 % de THF.

Con estas condiciones de gradiente se consigue la separación neta de las

Figura 12.- Optimización de las condiciones iniciales para la elución de las proteínas de mielina en RP-HPLC, utilizando mezclas de THF y agua como fase móvil. Se utilizó proteína básica comercial de conejo. Los trazos discontinuos representan los gradientes aplicados en cada cromatograma. Los dos solventes utilizados para la formación de los gradientes (THF y agua) contuvieron TFA al 0.1%. En (a) y (b), el contenido inicial de THF en la fase móvil fue del 0% (100% de agua). En (c), el contenido inicial de THF fue del 40%, y en (d), del 30%. Obsérvese que para contenidos iniciales de THF superiores al 30% (c), la proteína básica no interacciona con la fase estacionaria, y eluye en el volumen vacío de la columna (V_0). En a-c se inyectaron 250 μg de proteína básica disuelta en TFA al 0.1% en agua (25 μl). En d, se inyectaron 125 μg de proteína (12.5 μl). Columna Altex RPSC Ultrapore analítica. Flujo de 1 ml/min. UA, unidades de absorbancia a 280 nm.



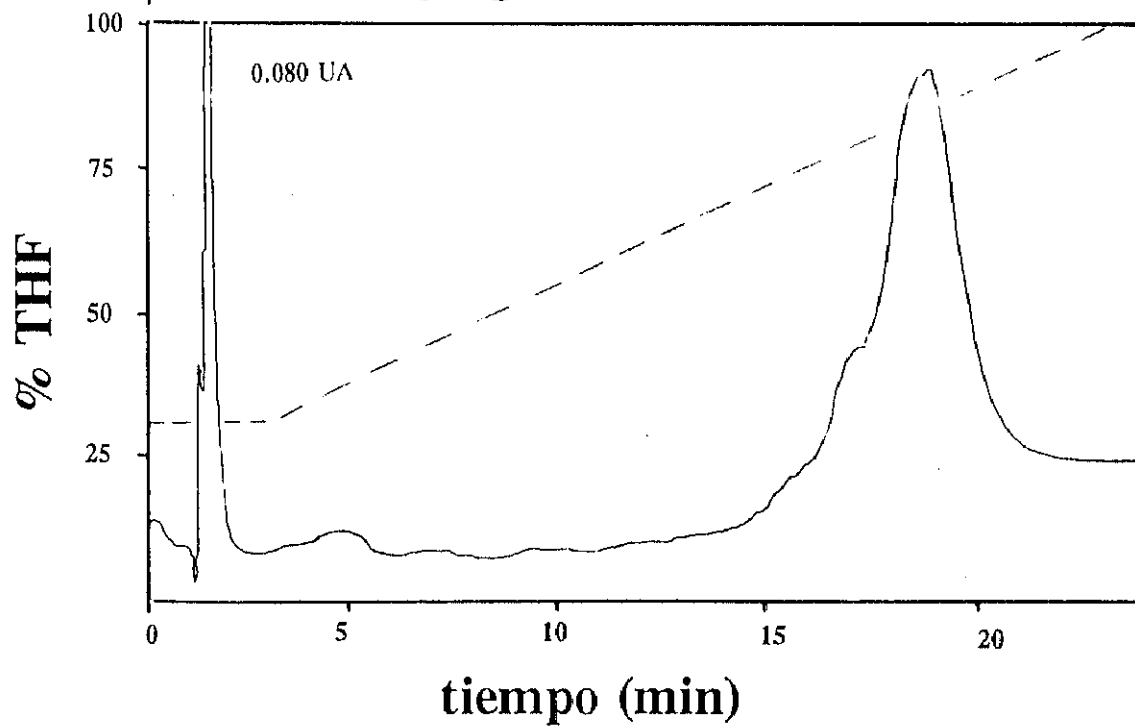
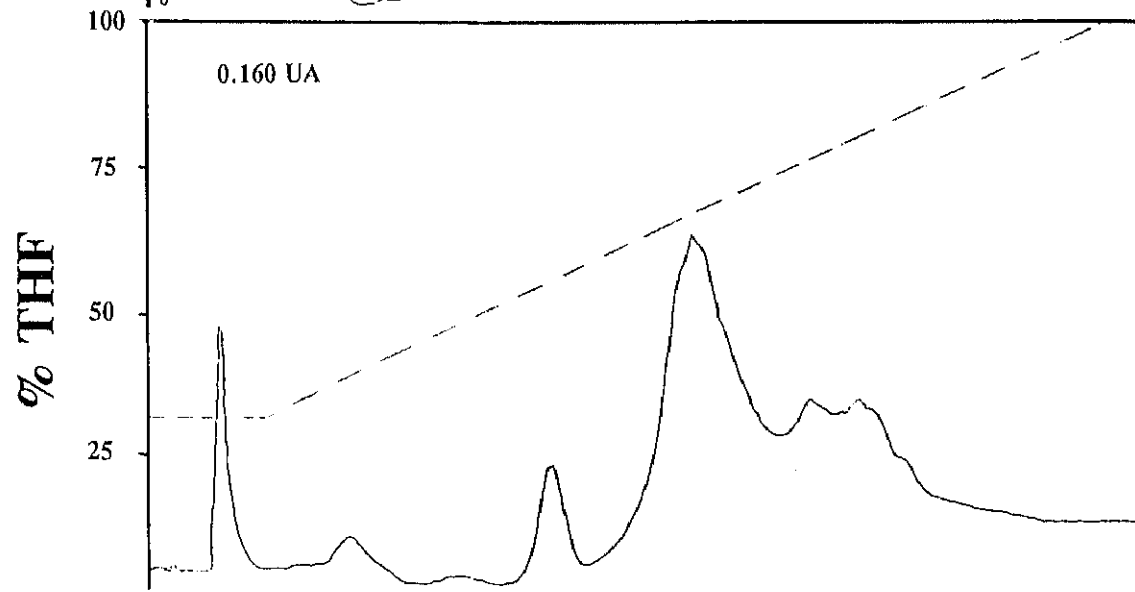
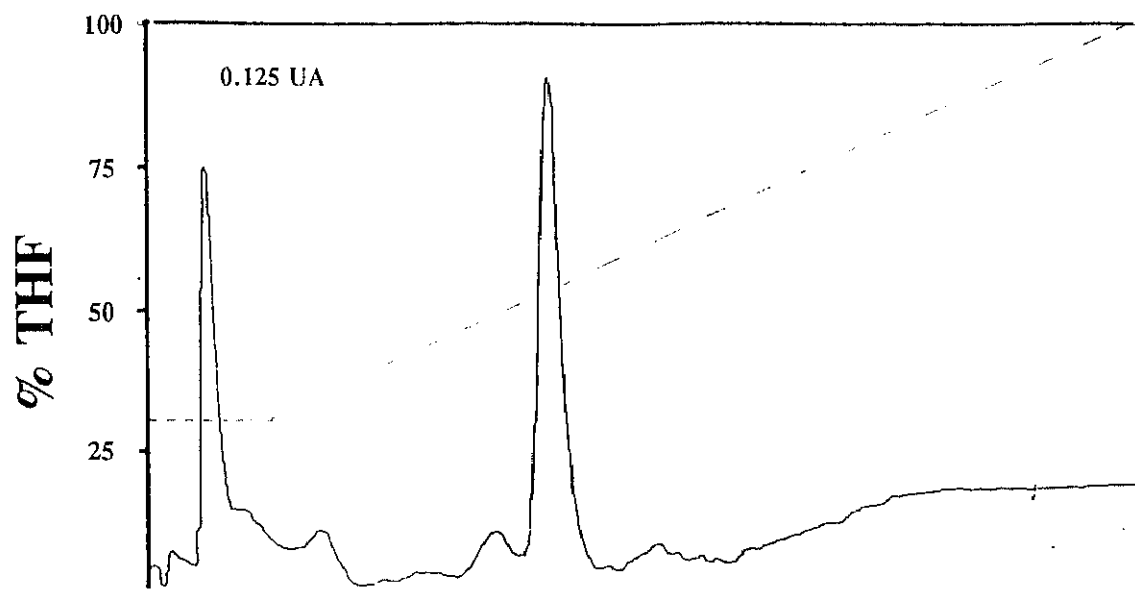
tres fracciones proteicas que componen la membrana mielínica en un intervalo de tiempo bastante corto (20 minutos). El orden de elución coincide con el orden de hidrofobicidad conocido de cada una de las fracciones.

Otro de los factores que afectaron al proceso de separación de las proteínas de mielina fue la composición del solvente utilizado para disolver la muestra. Ésta afectó especialmente a la proteína básica. El efecto se ilustra en la Figura 14, en la que una mezcla de proteína básica bovina comercial (Sigma) y proteolípidos purificados de sustancia blanca se inyectaron simultáneamente. Cuando el solvente en que va disuelta la muestra tiene idéntica composición a la de la mezcla inicial del gradiente (THF/agua 30:70, 0.1 % TFA; Figura 14a), ambas proteínas interactúan con la fase estacionaria. Sin embargo, cuando las proteínas se inyectan disueltas en concentraciones mayores de THF (THF/agua 80:20, 0.1 % TFA), la proteína básica eluye prácticamente en su totalidad en el frente del solvente, mientras que la elución de los proteolípidos no se afecta (Figura 14b).

Separación de las proteínas de mielina: preparación de la muestra

Establecidas las condiciones óptimas de elución con cada una de las fracciones proteicas por separado, se pasó a estudiar la separación de las proteínas totales de mielina. Se comprobó que un requisito fundamental para conseguir buena resolución fue la delipidación de la membrana antes de la inyección. Los lípidos, que en la membrana mielínica suponen el 75 % del peso seco total, disminuyen la resolución de las fracciones, especialmente de las proteínas Wolfram y proteolípidos, y además producen insolubilizaciones indeseables cuando la muestra se diluye con agua antes de ser inyectadas. La delipidación de la membrana se llevó a cabo en primer término utilizando un Sephadex lipofílico, el Sephadex LH-60 (Bizzozero et al., 1982 (22)). Para ello, la mielina purificada se disolvió en THF/agua 4:1, 0.1 % TFA a una concentra-

Figura 13.- Elución de las tres fracciones proteicas de la mielina bajo las mismas condiciones de elución: condiciones isocráticas durante 3 min con 30% de THF en agua, seguido de un gradiente lineal de 20 min desde 30% hasta 100% de THF en agua. Los dos solventes utilizados para la formación del gradiente (el THF y el agua) contuvieron TFA al 0.1%. (a), proteína básica aislada con soluciones de CaCl_2 a partir de mielina purificada: 250 μg de extracto liofilizado disuelto en 50 μl de solvente. (b), proteínas de mielina insolubles en CM 2:1 (fracción Wolfgram): 300 μg de proteína total en 100 μl de solvente. (c), proteolípidos extraídos de sustancia blanca, delipidados por cromatografía en Sephadex LH-60: 175 μg de proteína en 200 μl de solvente. En (a) y (b), las muestras se inyectaron disueltas en THF/agua 30:70 v/v, 0.1 % TFA. En (c), la muestra se inyectó en THF/agua 4:1 v/v, 0.1% TFA. Columna Altex RPSC Ultrapore C3 analítica. Flujo de 1 ml/min.



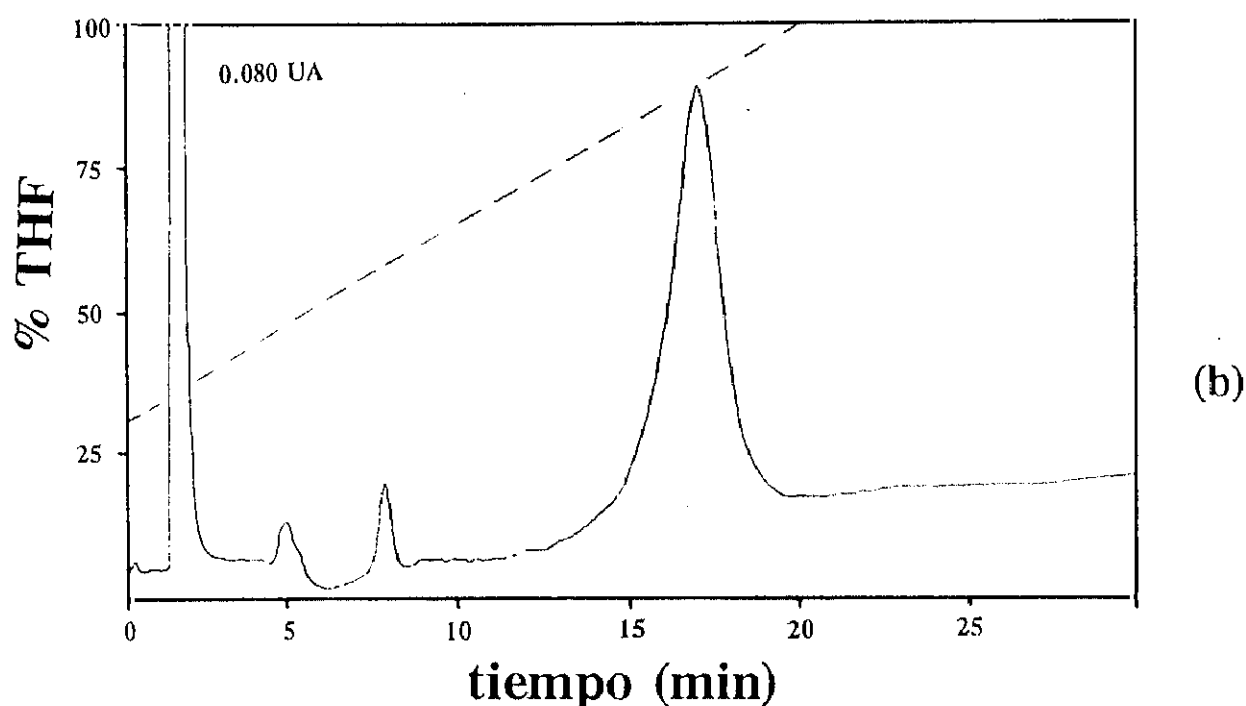
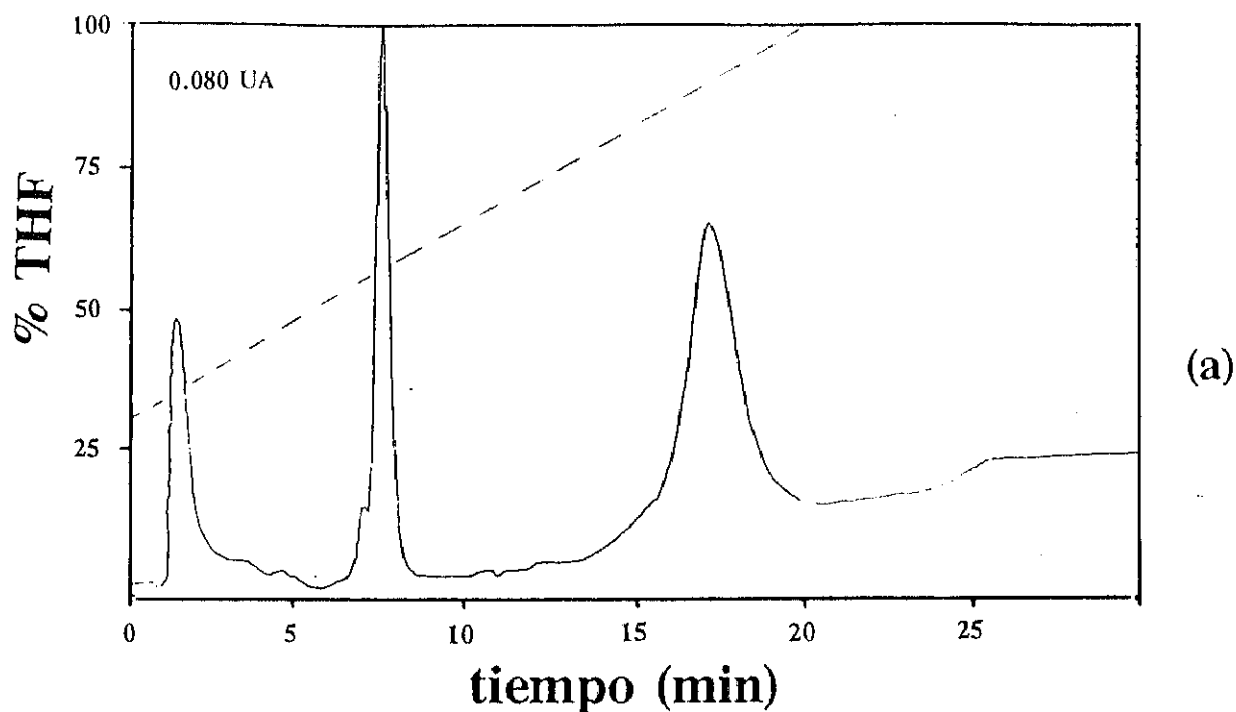


Figura 14.- Efecto de la composición del solvente en que se disuelve la muestra sobre la elución de la proteína básica. En (a), 100 μg de proteína básica bovina comercial (Sigma) y 110 μg de proteolípidos delipidados se inyectaron disueltos en 300 μl de THF/agua 30:70 v/v, 0.1 % TFA. En (b), 125 μg de proteína básica y 150 μg de proteolípidos se inyectaron disueltos en 300 μl de THF/agua 80:20 v/v, 0.1 % TFA. Las altas concentraciones de THF en la solución de la muestra evitan la interacción de la proteína básica con la fase estacionaria, eluyendo en el frente del solvente (V_0).

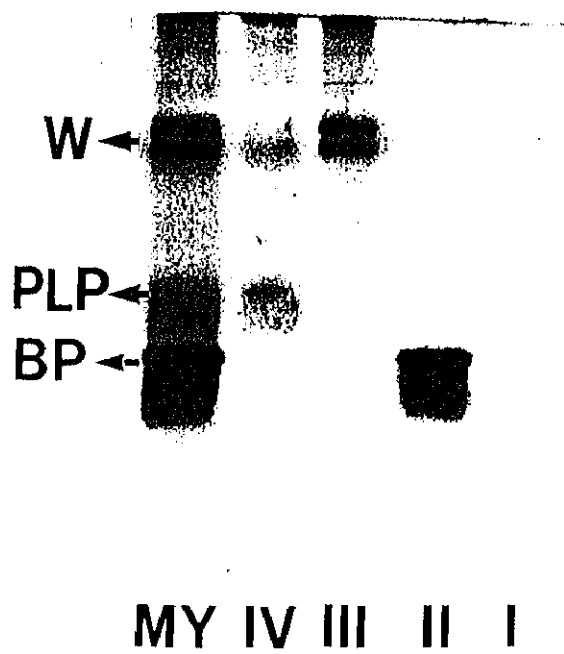
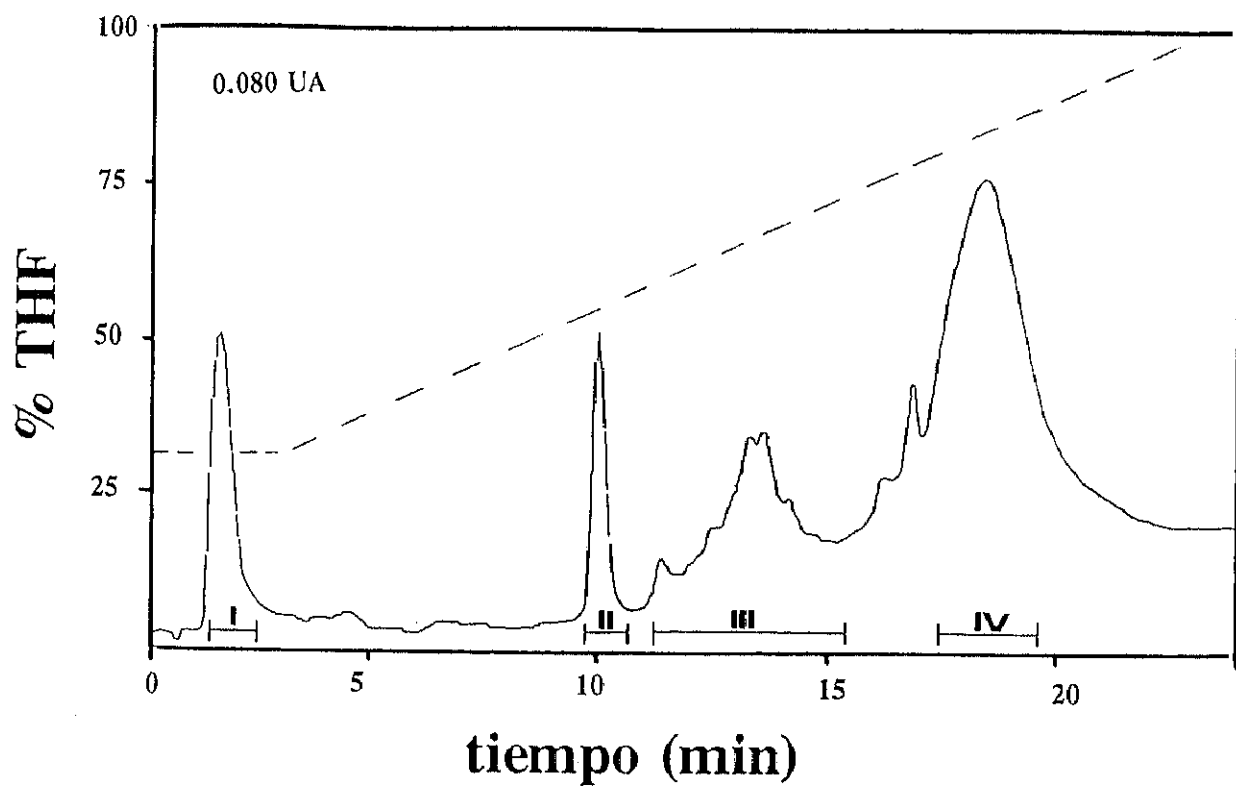
ción de 2 mg de proteína por ml. Un mililitro de la solución se cargó por cada 5 ml de resina empaquetada en una columna, hinchada y equilibrada con THF/agua 4:1, 0.1% TFA, y se eluyó con la misma mezcla. En esta resina las proteínas salen excluidas en el volumen vacío (V_0), mientras que los lípidos se retienen. Con este sistema se alcanzan delipidaciones próximas al 95%, según se deduce del contenido en fósforo lipídico de la muestra antes y después del paso por la columna. Antes de inyectar, la muestra se diluyó con TFA al 0.1% en agua hasta rebajar la concentración de THF hasta el 30%. La presencia del ácido y la casi total ausencia de lípidos asegura la completa solubilidad de las proteínas después de la dilución. Muestras con mayor contenido lipídico producen turbidez aparente cuando se diluyen. Como se mostró en la Figura 14, esta concentración de THF (30%) garantiza la interacción de la proteína básica con la fase estacionaria, evitando que salga excluida junto al frente del solvente.

La Figura 15 muestra el cromatograma típico de una muestra de mielina preparada como se acaba de describir, y en las mismas condiciones de elución que se utilizaron con cada una de las fracciones proteicas aisladas (Figura 13). Las fracciones señaladas en el cromatograma se colectaron, se liofilizaron y se procesaron para electroforesis. Debajo del cromatograma se muestran los resultados en un gel teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250. La fracción I, el frente del solvente, no contiene ninguna proteína detectable. La fracción II produce una banda intensa que corresponde a la proteína básica; la fracción III, un intenso doblete junto a otras bandas minoritarias de mayor peso molecular corresponde a la fracción Wolfgram. La fracción IV está compuesta por los proteolípidos y sus agregados de alto peso molecular, éstos últimos visibles en el gel como una banda difusa que comigra con la banda inferior del doblete principal de la fracción Wolfgram. Cada una de las fracciones eluye a un tiempo de retención idéntico al que presentan cuando las mismas proteínas, aisladas por otros métodos, se inyectan por separado (Figura 13).

Aunque el método de delipidación por el Sephadex LH-60 dio resultados satisfactorios, su mayor limitación fue que las soluciones de proteínas delipidadas se obtienen bastante diluidas (aproximadamente 1 mg de proteína por ml). Como antes de la inyección en el cromatógrafo es necesario diluir nuevamente la muestra para rebajar su contenido en THF, la cantidad máxima de proteína que se puede inyectar en la columna, utilizando un *loop* de 500 μ l, es de unos 300 μ g. Para solventar este problema, se probó otro método de delipidación, basado en la observación de que, minimizando el contenido de agua en el medio de extracción, el THF disuelve muy pequeñas cantidades de proteína a partir de membrana mielínica purificada (ver Figura 10a), mientras que extrae gran cantidad de lípidos. La extracción secuencial de mielina liofilizada con THF anhidro, como se describe en Materiales y Métodos (ver Pag. 110), rinde un residuo constituido por proteínas altamente delipidadas y muy solubles en THF/agua 4:1, 0.1% TFA. Los resultados más satisfactorios se consiguieron repitiendo el tratamiento de THF un total de seis veces. La recuperación de proteína del procedimiento completo se acerca al 90%, y la delipidación es de un 95%. Por cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC) se comprobó que los lípidos residuales que permanecen unidos a las proteínas tras los seis tratamientos con THF son, sobre todo, de naturaleza ácida: sulfátidos, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Se detectan, así mismo, trazas de esfingomielina, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. La alta solubilidad de las proteínas delipidadas en THF/agua 4:1, 0.1% TFA, permite conseguir soluciones concentradas de al menos 6 mg de proteína por ml.

La Figura 16 muestra un cromatograma típico de la mielina delipidada en estas condiciones, tras una inyección de 700 μ g de proteína, en las mismas condiciones de elución que las mostradas en la Figura 15. Con respecto a la Figura 15, se observa mejor resolución en las fracciones intermedias, correspondientes a las proteínas de la fracción Wolfgram, que en estas condiciones se

Figura 15.- Separación por RP-HPLC de las proteínas principales de mielina a partir de la membrana purificada. La mielina se delipidó por cromatografía en Sephadex LH-60, como se indica en Materiales y Métodos. Ciento cincuenta microgramos de proteína total, disueltos en 250 μ l de THF/agua 30:70 v/v, 0.1% de TFA, se inyectaron en la columna Altex RPSC Ultrapore C3 analítica. Tras 3 min en condiciones isocráticas (THF/agua 30:70, 0.1% TFA), se aplicó un gradiente lineal desde 30% hasta 100% de THF en agua, ambos conteniendo TFA al 0.1%. El flujo fue de 1 ml/min. Las fracciones indicadas en el cromatograma se recolectaron, liofilizaron y se procesaron para la electroforesis. Abajo se muestra la composición proteica de cada fracción, en un gel teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250. MY, mielina; W, fracción de proteínas Wolfgram; PLP, proteolípidos; BP, proteína básica.



resuelven como dos picos diferenciados (*b-c*). Las fracciones recolectadas (*a-e*) se analizaron por SDS-PAGE. Los geles, teñidos con el reactivo de plata, se muestran en la Figura 17. La gran sensibilidad de este reactivo permite detectar gran número de bandas, no detectables mediante la tinción de Coomassie.

La fracción *a*, a alta concentración de proteína (Figura 17, gel superior), se resuelve en los geles como una banda intensa con peso molecular aparente de 22 KDa, que corresponde a la isoforma de 18.5 KDa de la proteína básica (Cheifetz y Moscarello, 1985 (28); Giegerich et al., 1990 (8)), además de una banda de peso molecular superior y al menos dos de peso molecular inferior. Estas bandas deben corresponder a las otras isoformas de proteína básica encontradas en mielina bovina.

La fracción *b* está muy enriquecida en CNPasa, pero también aparece un gran número de otras proteínas de la fracción Wolfgram de alto peso molecular, así como otras de peso molecular inferior. La fracción *c* contiene otras proteínas de alto peso molecular, pero contiene muy poca CNPasa.

La fracción *d* se resuelve en los geles como dos bandas principales, una muy intensa y ancha con un peso molecular aparente de 17 KDa, y otra más estrecha y tenue de unos 30 KDa. La naturaleza de estas bandas es desconocida, pero a juzgar por su peso molecular, y su elución próxima a la de los proteolípidos, la banda de 17 KDa podría corresponder a la plasmolipina, el proteolípido inicialmente descrito en membranas plasmáticas de riñón pero recientemente detectado en membrana mielínica, donde podría representar hasta un 4.8% de la proteína total (Cochary et al., 1990 (29)). Un pico equivalente a la fracción *d* también apareció en las muestras delipidadas por cromatografía en Sephadex LH-60 (Figura 15), eluyendo como un pico agudo inmediatamente antes del pico de los proteolípidos, aunque no se recolectó ni analizó por electroforesis.

La fracción *e* está constituida exclusivamente por el proteolípido PLP y su isoforma DM20 (Figura 17, gel inferior). Cuando la cantidad de proteína

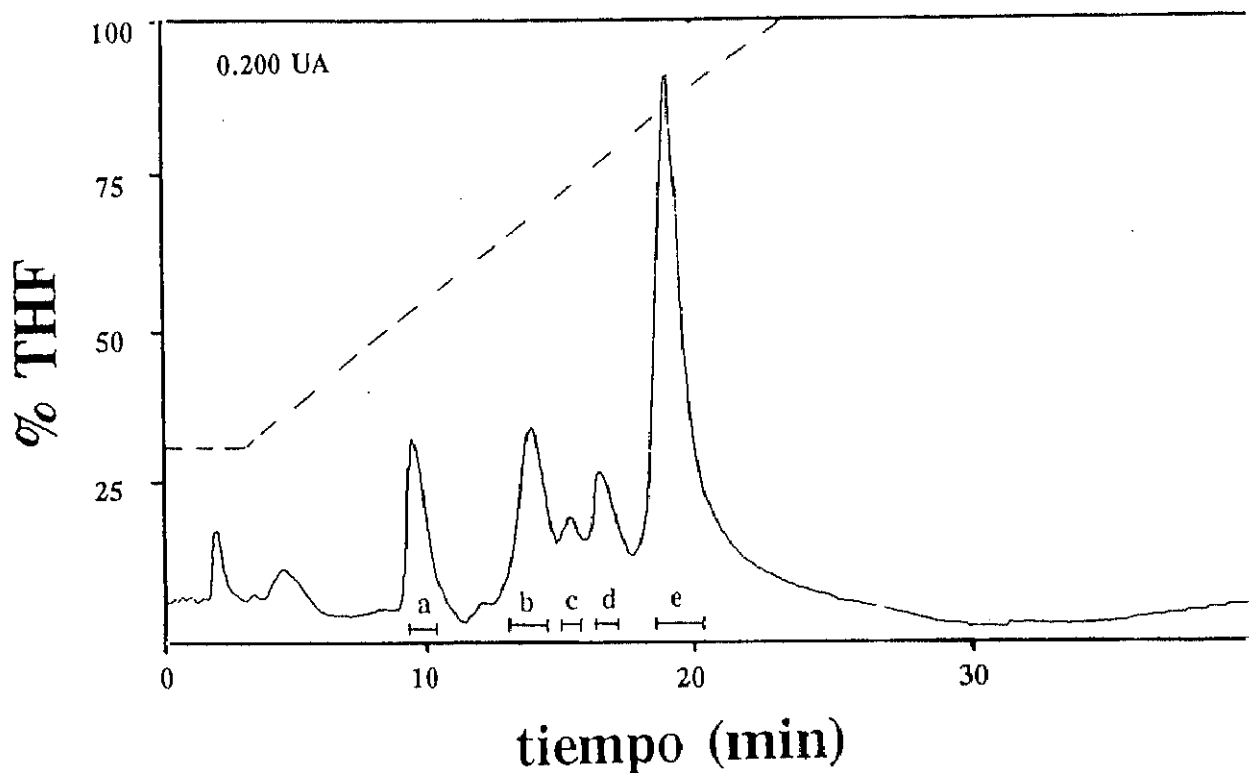


Figura 16.- Separación por RP-HPLC de las proteínas de mielina a partir de la membrana purificada. La mielina se delipidó mediante seis tratamientos secuenciales con THF anhidro, como se indica en Materiales y Métodos. Setecientos microgramos de proteína total, disueltos en 500 μ l de THF/agua 30:70 v/v, 0.1% de TFA, se inyectaron en la columna Altex RPSC Ultrapore C3 analítica. Las condiciones de elución fueron idénticas a las utilizadas en la Figura 15. Las fracciones que se indican se recolectaron, liofilizaron y se procesaron para la electroforesis.

sembrada en el gel es muy superior (Figura 17, gel superior, calle *e*), aparecen agregados proteolipídicos de alto peso molecular.

La gran ventaja del procedimiento de delipidación por tratamiento directo de la membrana liofilizada con THF anhidro es que se obtienen soluciones de proteínas delipidadas mucho más concentradas. Con la columna C3 analítica, y en las condiciones de elución mostradas en las Figuras 15 y 16, cantidades de hasta 1 mg de proteína total se resuelven satisfactoriamente en un período de tiempo corto (20 minutos).

Purificación de las proteínas de mielina a escala semipreparativa

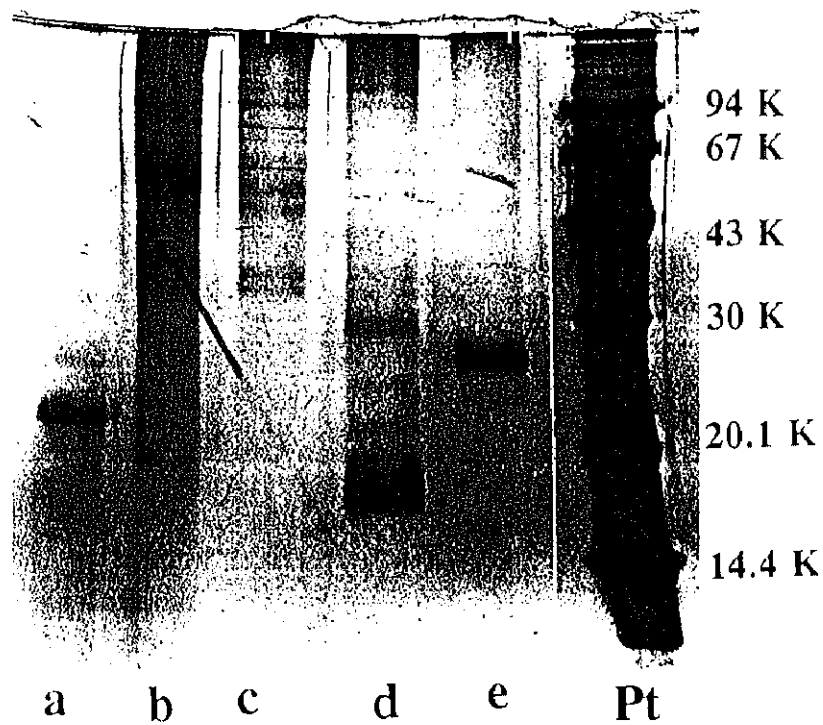
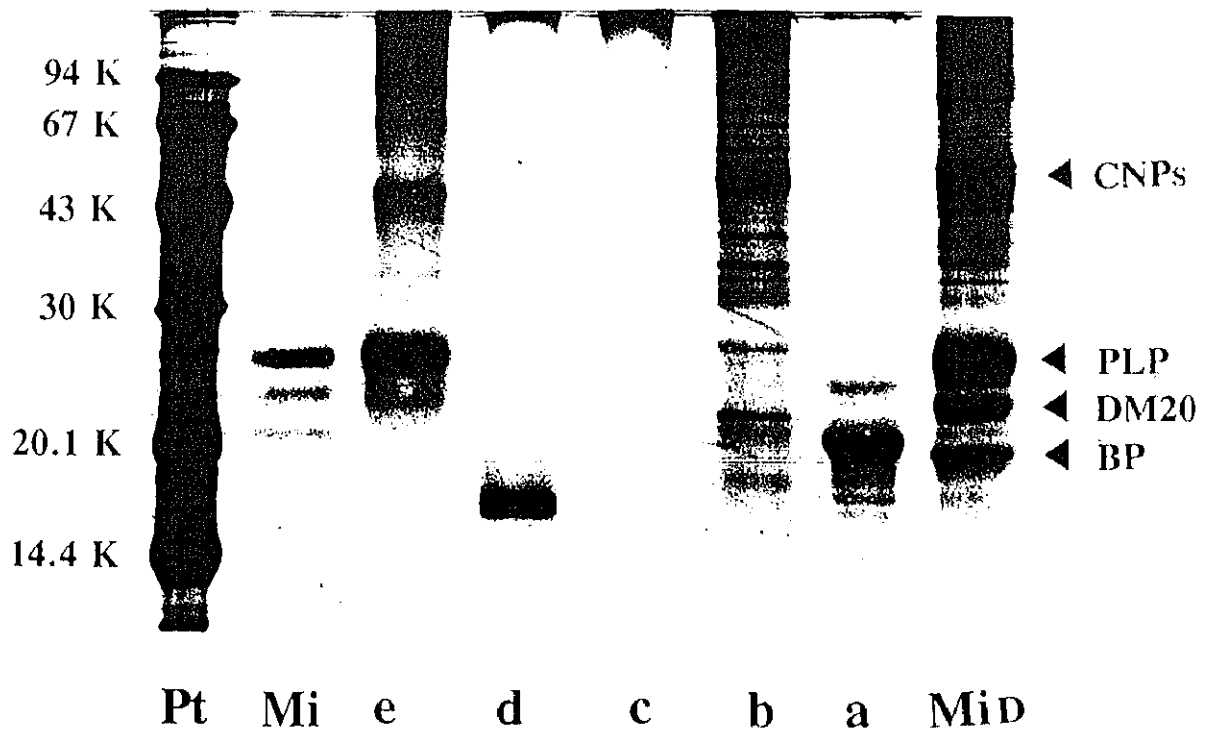
Con el fin de obtener mayores cantidades (miligramos) de cada una de las fracciones, se utilizó una columna C3 semipreparativa, de idénticas características a la columna analítica pero de mayor tamaño. Se ajustó el flujo de tal manera que los tiempos de retención de los picos fueran equivalentes a los obtenidos con la columna analítica, de acuerdo a la fórmula:

$$F_{sp} = F_a \times (D_{sp}/D_a)^2$$

donde F_{sp} y F_a son el flujo en las columnas semipreparativa y analítica, respectivamente, y D_{sp} y D_a son sus diámetros internos (Manual de uso de la columna, Beckman Instruments, Inc). El flujo equivalente encontrado para la columna semipreparativa fue de 4.7 ml/min.

La preparación de la muestra fue idéntica a las condiciones descritas para la columna analítica en la Figura 16: seis tratamientos con THF anhidro (8 ml de THF por 50 mg de membrana liofilizada). La membrana delipidada se disolvió en THF/agua 4:1, 0.1% TFA (6 mg de proteína/ml). La solución se diluyó con TFA al 0.1% en agua hasta una concentración final de THF en la muestra del 30% antes de la inyección. Cantidades de hasta 10 mg de proteína

Figura 17.- Análisis por SDS-PAGE de las fracciones recolectadas en el cromatograma de la Figura 16. **Pt**, proteínas patrón de peso molecular conocido; **Mi**, mielina liofilizada, no delipidada; **MiD**, mielina liofilizada, delipidada por seis tratamientos secuenciales con THF anhidro, como se indica en Materiales y Métodos. Las calles marcadas con la misma letra minúscula en los dos geles son equivalentes, y se corresponden con la fracción marcada con la misma letra en la Figura 16. Cuando se cargan cantidades relativamente altas de proteína en cada calle (**gel de arriba**), son distinguibles las isoformas minoritarias de la proteína básica (**a**), y los agregados proteolipídicos de alto peso molecular en la fracción correspondiente a los proteolípidos (**e**). Estos no son detectables cuando la cantidad de proteína cargada es muy inferior (**gel de abajo**). Tinción con reactivo revelador de plata.



total de mielina puede resolverse satisfactoriamente utilizando esta columna.

Las Figuras 18 y 19 muestran un cromatograma típico obtenido con esta columna, y la composición de las fracciones colectadas, respectivamente. Con respecto a los resultados obtenidos con la columna analítica, con la muestra delipidada en las mismas condiciones (Figura 16), se observa una ligera pérdida de resolución en las fracciones intermedias, que puede deberse a las características propias de la columna semipreparativa, pero también a la calidad del THF utilizado en cada caso. Así, el cromatograma de la Figura 16 se realizó utilizando un THF de alta transparencia ultravioleta a 280 nm (Merck, grado Lichrosolv), como demuestra la estabilidad de la línea de base al final del gradiente. El alto costo de este THF limita su uso a escala analítica, donde se usan flujos bajos (1 ml/min). Para la purificación semipreparativa se utilizó, sin embargo, el THF de Probus (grado HPLC), de menor transparencia ultravioleta que el de Merck, como demuestra la subida de la línea de base conforme va aumentando la concentración de THF durante el gradiente. Esta subida en la línea de base quizás puede afectar la resolución de los picos menos pronunciados, como los que producen las proteínas de la fracción Wolfgram. Los resultados electroforéticos (Figura 11) revelan, sin embargo, una separación neta entre la(s) proteína(s) básica(s) (fracción a), fracción Wolfgram (b), y proteolípidos (d). Como sucediera con la columna analítica, el pico previo a los proteolípidos (c) contiene una proteína que aparece en el gel como una banda intensa y ancha a un peso molecular aparente de 17 KDa, que debe corresponder a la plasmolipina.

Purificación de proteína básica a partir del extracto crudo de sustancia blanca

Con el propósito de purificar a gran escala la proteína básica de mielina bovina, se utilizó el extracto crudo de sustancia blanca de Oshiro y Eylar, 1970 (15). El método rindió 0.89 g de extracto crudo liofilizado, altamente enriqueci-

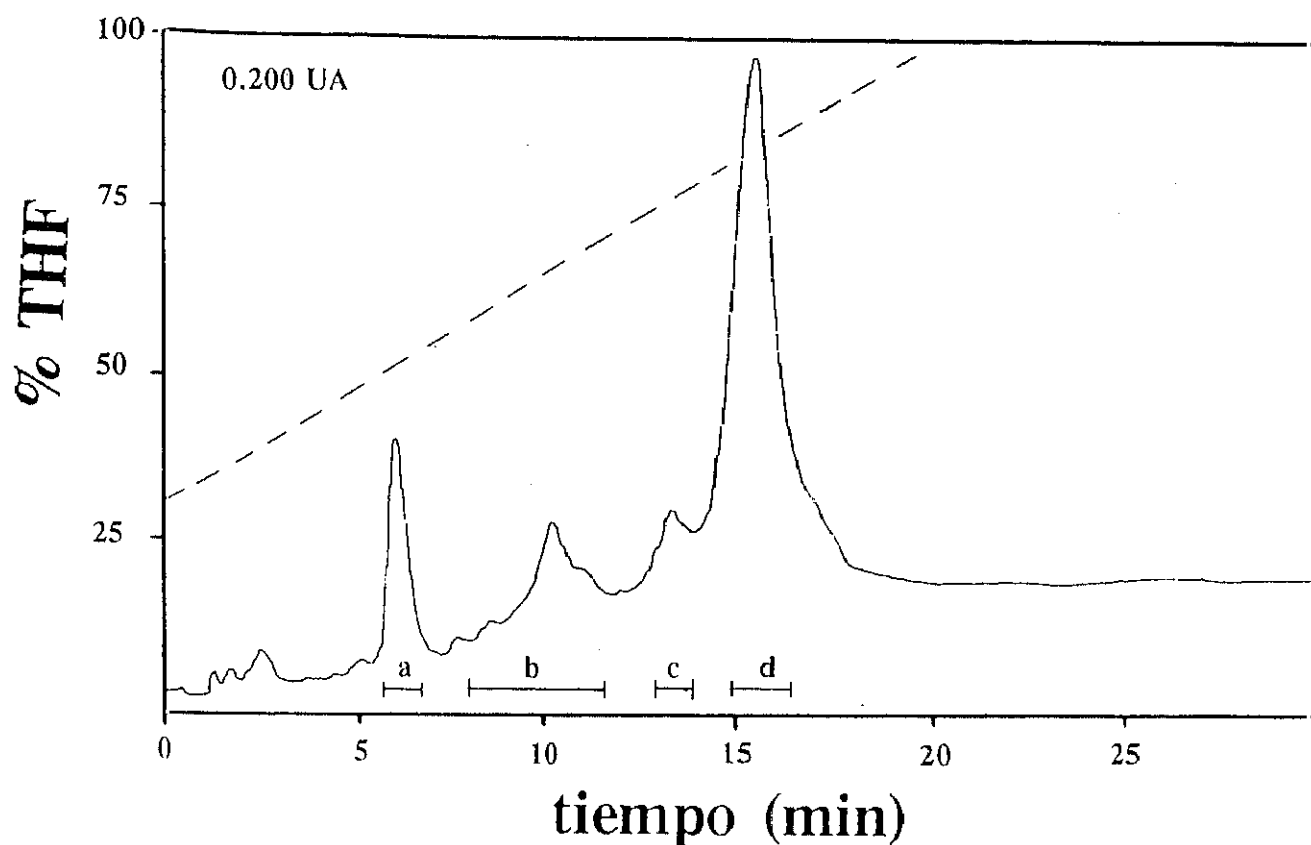


Figura 18.- Purificación de las proteínas de mielina, a partir de la membrana purificada, a escala semipreparativa. La mielina se delipidó por séis tratamientos secuenciales con THF anhidro. Cinco miligramos de proteínas totales, disueltas en 2 ml de THF/agua 30:70 v/v, 0.1 % de TFA, se inyectaron sobre la columna Altex RPSC Ultrapore C3 semipreparativa. Las condiciones de elución fueron: gradiente lineal desde 30% de THF hasta 100% de THF en agua durante 20 min. Los dos solventes (THF y agua) contuvieron TFA al 0.1%. El flujo fue de 4.7 ml/min. Las fracciones señaladas se recolectaron, liofilizaron y procesaron para la SDS-PAGE.

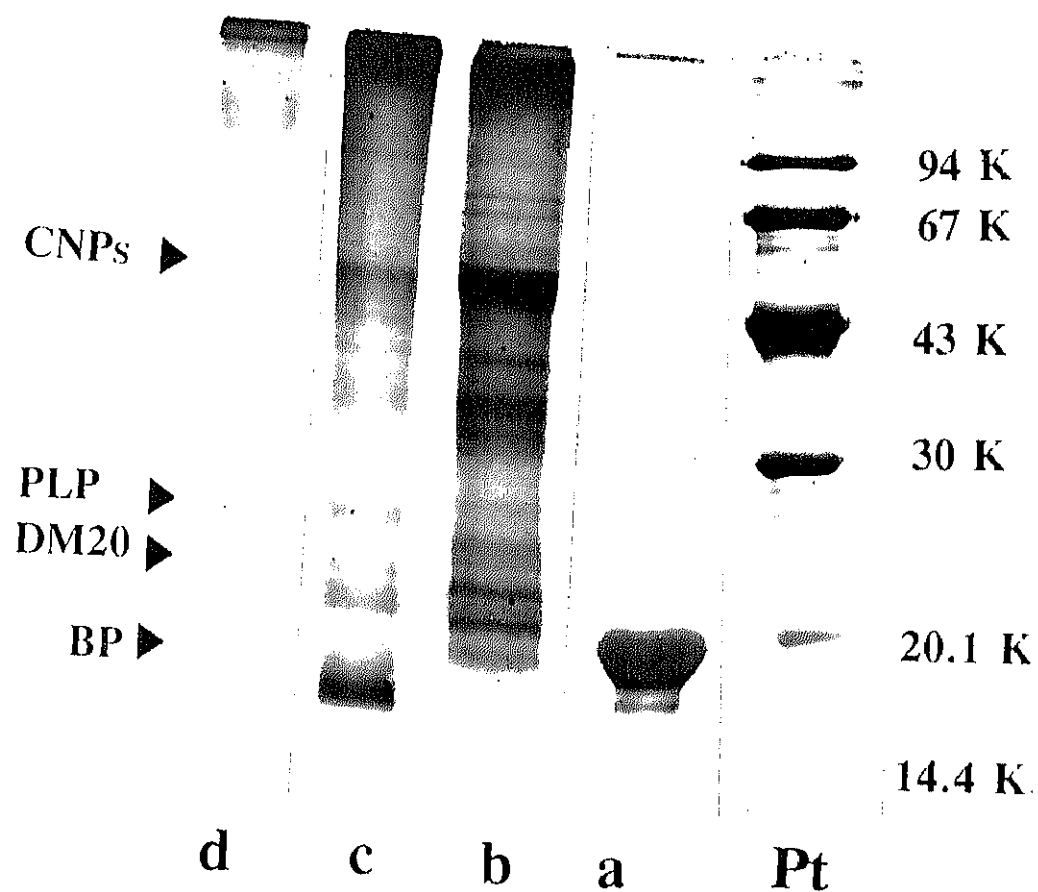


Figura 19.- Análisis por SDS-PAGE de las fracciones recolectadas en el cromatograma de la Figura 18. Pt, proteínas patrón de peso molecular conocido. Las calles marcadas con letras minúsculas se corresponden a las fracciones marcadas con la misma letra en el cromatograma de la Figura 18. Gel teñido con el reactivo de plata.

do en proteína básica, a partir de 159 g de sustancia blanca fresca de cerebro bovino. Si el único propósito es el de purificar proteína básica, es preferible utilizar este material como punto de partida en vez de membrana mielínica, ya que los procedimientos de purificación de mielina son mucho más laboriosos y costosos.

En la Figura 20a se muestra un cromatograma típico del extracto crudo liofilizado de proteína básica, en la columna analítica. Se inyectaron cantidades entre 0.5 y 1 mg de proteína total sin que cambiara la resolución, simetría o tiempos de retención de los picos (no mostrado). Rutinariamente, el extracto crudo liofilizado se disolvió en THF/agua 30:70, 0.1 % TFA, a una concentración de 5 mg de proteína por ml. Aliquotas de 175 μ l de esta solución se inyectaron directamente en la columna (875 μ g de proteína). Las condiciones de elución fueron: isocrático durante tres minutos con la mezcla inicial (THF/agua 30:70, 0.1 % TFA) seguido de un gradiente lineal desde 30% hasta 100% de THF en agua (ambos con 0.1 % TFA) durante 20 minutos, a un flujo de 1 ml/min. Las fracciones equivalentes a la delimitada por las flechas en la Figura 20a se colectaron, se juntaron, se dializaron frente a un gran exceso de agua milli-Q a 4 °C durante 24 horas y se liofilizaron. La Figura 20b muestra la pureza cromatográfica de la proteína obtenida, tras una inyección de 400 μ g de proteína.

Aunque la columna analítica soporta cantidades relativamente grandes de proteína, para ciertas aplicaciones específicas en las que se necesitan grandes cantidades de proteína altamente purificada puede ser necesaria una purificación a escala semipreparativa. En la Figura 21a se muestra un cromatograma obtenido tras la inyección de 10 mg de extracto crudo liofilizado en la columna semipreparativa. Rutinariamente, se disolvió el extracto crudo a una concentración de 10 mg de proteína por ml de THF/agua 30:70, 0.1 % TFA. Aliquotas de 1 ml de esta solución se inyectaron en la columna, y se eluyó con un gradiente lineal

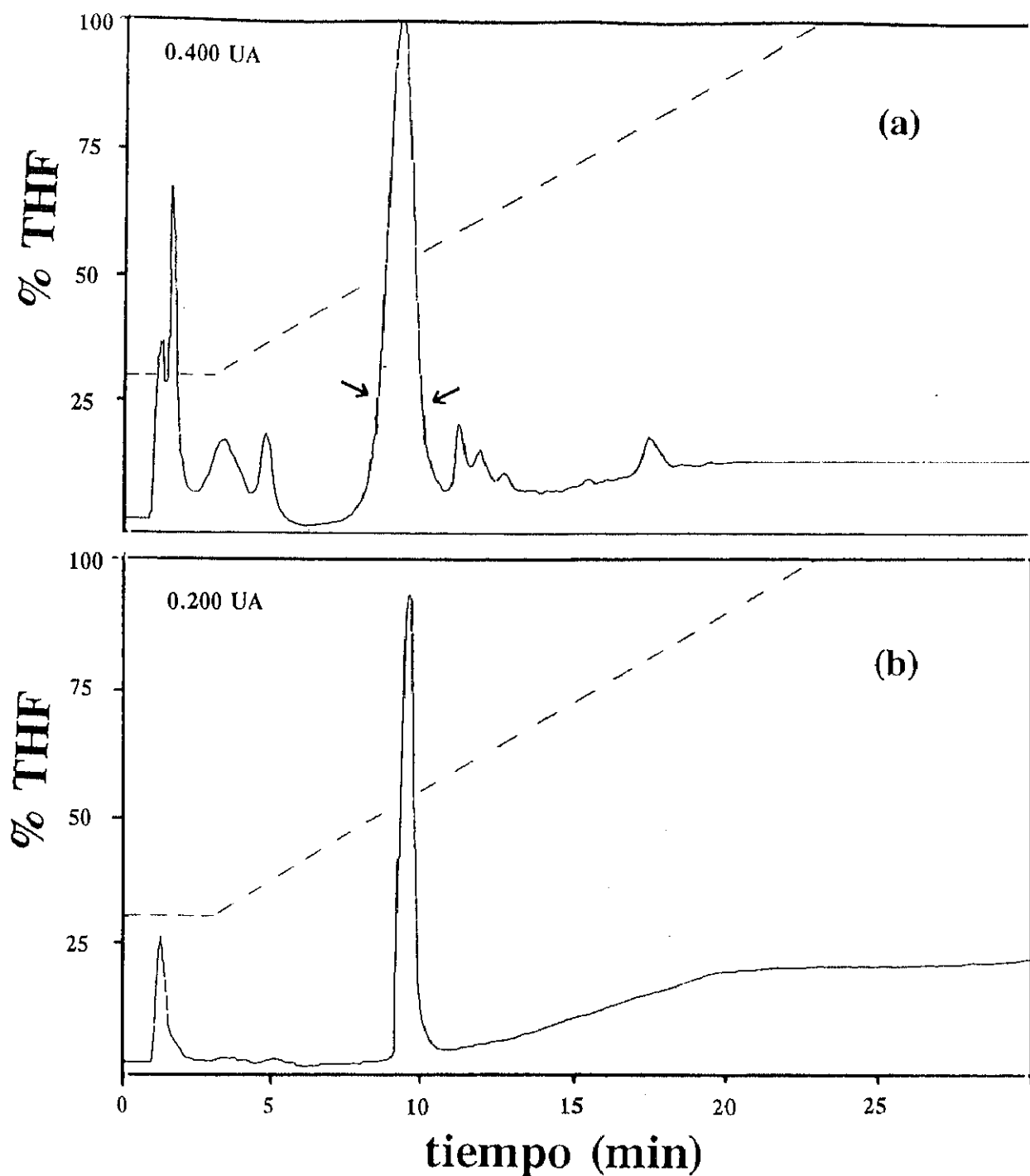
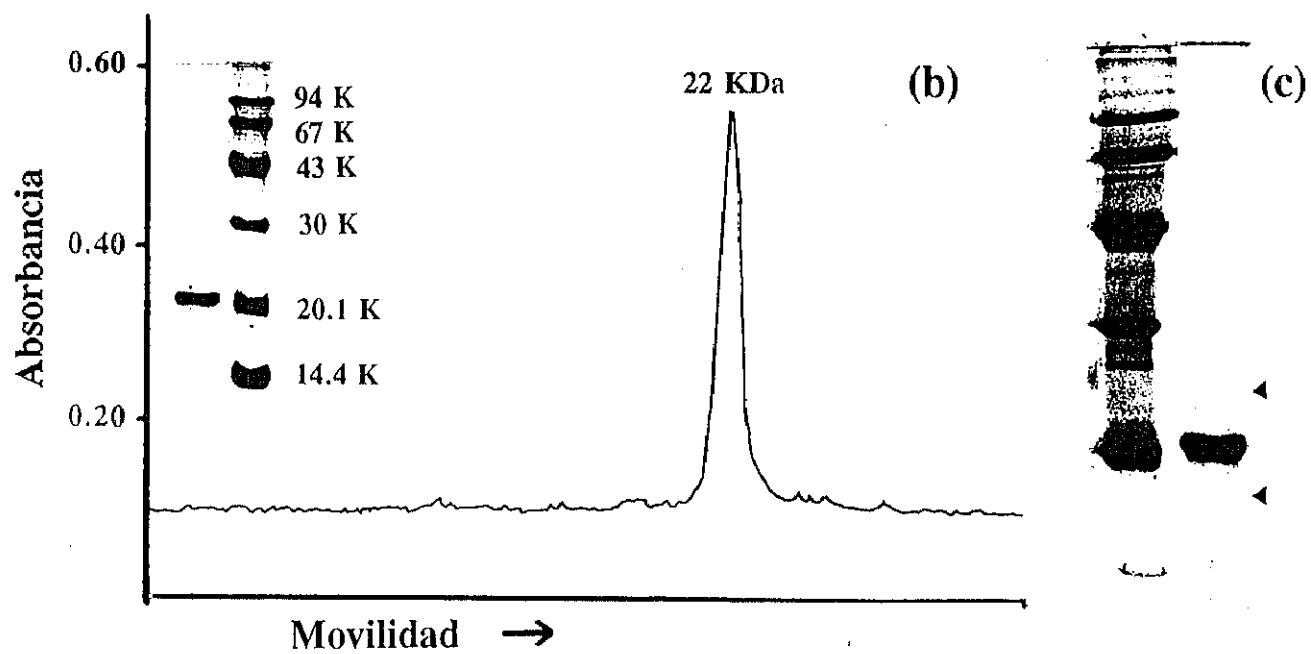
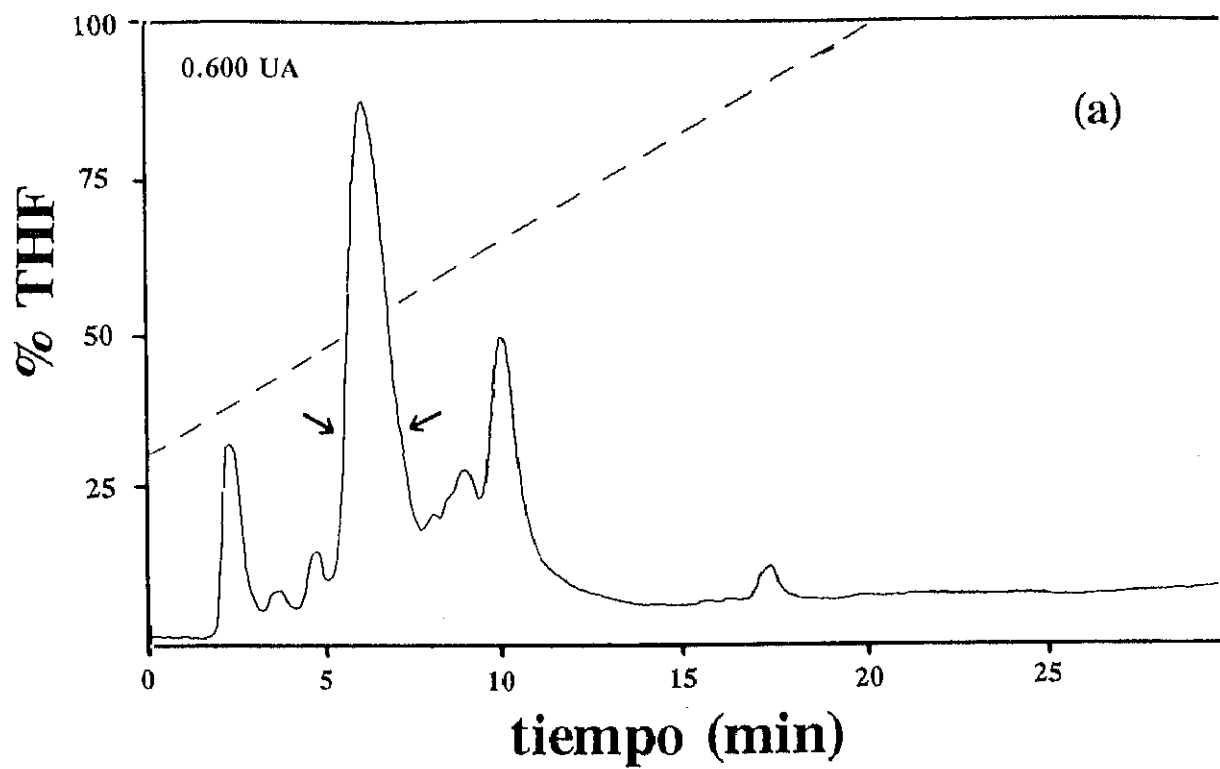


Figura 20.- Purificación de proteína básica utilizando la columna C3 analítica, a partir de un extracto crudo obtenido de la sustancia blanca del cerebro. Rutinariamente, 875 μg de extracto crudo liofilizado, disuelto en 175 μl de THF/agua 30:70 v/v, 0.1% TFA, se inyectaron en la columna Altex RPSC Ultrapore C3 analítica (a), en las condiciones de elución marcadas por el trazo discontinuo de los cromatogramas. Las fracciones equivalentes a la acotada por las flechas se recolectaron, dializaron y liofilizaron. (b), doscientos cincuenta microgramos de la proteína purificada se recromatografiaron en las mismas condiciones. Sólo se detectó el pico correspondiente a la proteína básica, además del pico inicial (frente del solvente).

desde 30% hasta 100% de THF en agua (ambos con 0.1% TFA). Las fracciones equivalentes a la acotada por las flechas en la Figura 21a se procesaron de igual forma que las obtenidas con la columna analítica. En la Figura 21b se muestra la pureza de la fracción obtenida, tras la electroforesis de 2.5 μ g del liofilizado final en un gel con 14% de acrilamida y la tinción con Coomassie. El densitograma muestra un único pico con peso molecular aparente de 22 KDa, que corresponde a la isoforma de 18.5 KDa de la proteína básica. Aunque su peso molecular real es de 18.5 KDa, en SDS-PAGE aparece muy a menudo en la zona de 21-22 KDa (ver, por ejemplo, Cheifetz y Moscarello, 1985 (28) o Giegerich et al., 1990 (8)). Con cantidades de proteína mucho mayores (7 μ g), y con la tinción de plata (Figura 21c), son observables dos bandas tenues a pesos moleculares aparentes de 26 KDa y 18 KDa (marcadas por cabezas de flecha), que deben corresponder a las otras dos isoformas minoritarias de proteína básica bovina, con peso molecular real de 21.5 y 17.3 KDa, respectivamente (Kerlero de Rosbo et al., 1991 (30)). Aunque no se muestra, la pureza electroforética de la proteína purificada con la columna analítica es similar.

En otra serie de experimentos se intentó analizar el impacto que el proceso de purificación (exposición al THF, interacciones con la fase estacionaria) pudiera haber ejercido sobre la proteína. Las propiedades de solubilidad no se ven modificadas: la proteína purificada es soluble a altas concentraciones en agua. Es conocida la interacción de la proteína básica con los fosfolípidos, especialmente si éstos son ácidos. Así, esta proteína es capaz de inducir la agregación de liposomas unilamelares pequeños (SUVs) si éstos contienen fosfolípidos negativos, de una manera típicamente cooperativa (Wood y Moscarello, 1989 (31)). La Figura 22 revela que el paso por la columna semipreparativa y la exposición a las mezclas de THF y agua no modifican las propiedades de agregación de la proteína frente a liposomas preparados con los lípidos endógenos de la mielina (ver capítulo V). La potencia encefalitogénica

Figura 21.- Purificación a escala semipreparativa de la proteína básica de mielina a partir de un extracto crudo obtenido de la sustancia blanca del cerebro. Rutinariamente, se inyectaron 10 mg de extracto crudo liofilizado disuelto en 1 ml de THF/agua 30:70 v/v, 0.1% TFA sobre la columna Altex RPSC Ultrapore C3 semipreparativa. Las fracciones equivalentes a la acotada con flechas en el cromatograma (a) se recolectaron, dializaron y liofilizaron. En (b) se muestra el análisis de 2.5 μ g de la proteína purificada por SDS-PAGE tras la tinción con Coomassie (inserto), y su perfil densitométrico. Unicamente se detecta una banda con peso molecular aparente de 22 KDa. En (c) se analizaron 7 μ g de la proteína purificada en un gel de idénticas características, pero teñido con el reactivo de plata. La tinción con plata revela bandas muy tenues (cabezas de flecha) por encima y por debajo de la banda principal.



de la proteína tampoco parece verse afectada: la proteína purificada con la columna semipreparativa se inyectó por vía intramuscular en emulsión con adyuvante completo de Freund a dos conejos (200 μg /conejo). A los 15 y 30 días de la primera inyección se administraron dosis de recuerdo de 200 y 100 μg , respectivamente. Los dos conejos presentaron síntomas evidentes de encefalitis alérgica experimental (parálisis total de las extremidades inferiores), uno de ellos a los dos meses y medio y el otro a los tres meses desde la primera inyección, y murieron pocos días después.

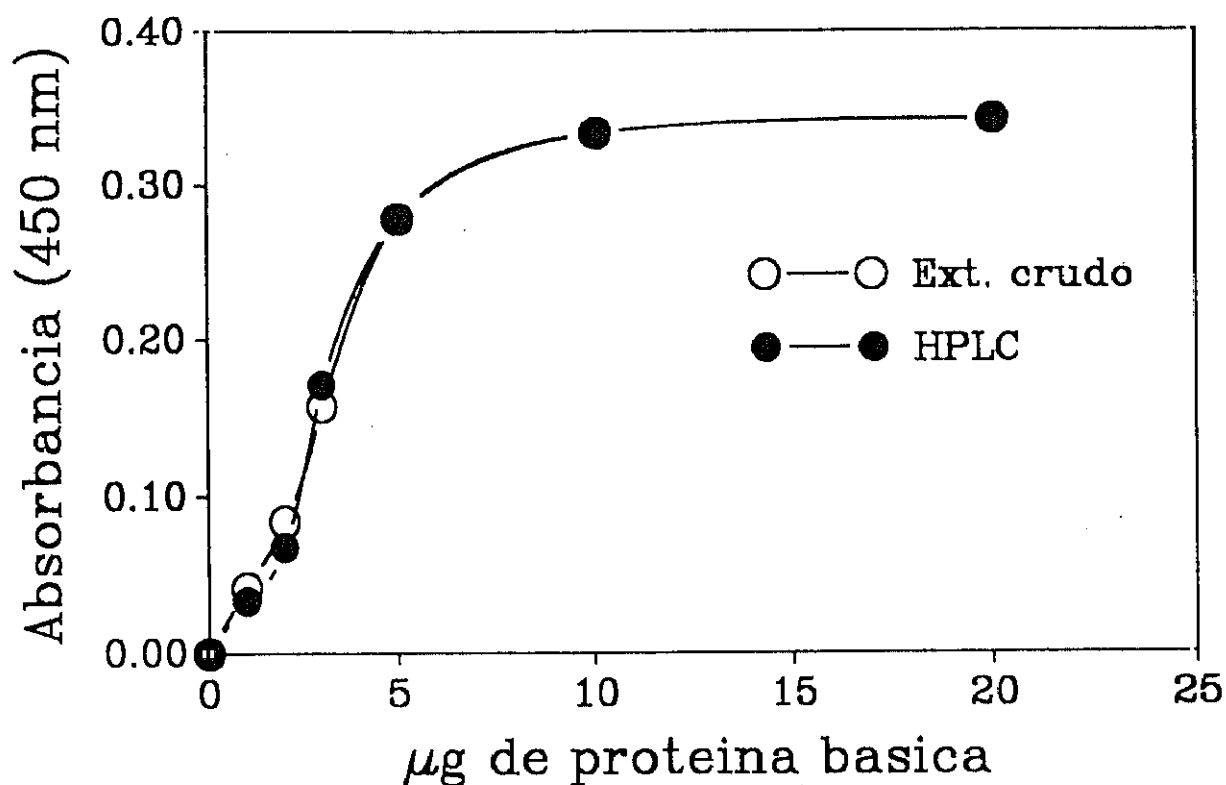


Figura 22.- Efecto del proceso de purificación por RP-HPLC de la proteína básica sobre su capacidad de agregación de vesículas lipídicas conteniendo lípidos ácidos. Se prepararon liposomas unilamelares pequeños (SUVs) a partir de un extracto lipídico total de sustancia blanca (ver capítulo 5), a concentración de 1 mg de lípido/ml, en tampón NaCl 100 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4. Aliquotas de 500 μl de la suspensión de liposomas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con 100 μl del mismo tampón conteniendo cantidades crecientes de proteína básica purificada por RP-HPLC (columna analítica), o cantidades crecientes de extracto crudo liofilizado conteniendo cantidades equivalentes de proteína básica (1 mg de extracto crudo contiene 0.8 mg de proteína básica). Transcurrido el período de incubación, se determinó la turbidez de las suspensiones midiendo su absorbancia a 450 nm. Como blanco se usó la mezcla de 500 μl de suspensión de liposomas y 100 μl de tampón (sin proteína básica). El paso por la columna de RP-HPLC y la exposición al THF no modifican las propiedades de agregación de la proteína.

DISCUSION

Los puntos fundamentales demostrados en este capítulo son que las mezclas de THF y agua son solventes efectivos para la disolución de proteolípidos purificados (Figura 9) y la extracción de proteínas a partir de tejido cerebral (Figura 11) y membrana mielínica purificada (Figura 10). En virtud de su poder solubilizante y de sus parámetros físico-químicos, constituyen una fase móvil muy útil para la separación rápida de las proteínas de mielina mediante la técnica de HPLC en fase reversa.

Snyder (1974 (18)) propuso, como primera aproximación para investigar la solubilización completa de un soluto, encontrar la polaridad óptima para su disolución utilizando la mezcla de dos solventes con diferentes índices de polaridad (P'). Tras ello, la selectividad más apropiada se investigaría utilizando mezclas con idéntico índice de polaridad al encontrado en el primer experimento, pero pertenecientes a diferentes grupos de selectividad. Con este planteamiento inicial se realizó un amplio estudio de solubilidad del proteolípido purificado en una gran cantidad de solventes puros y mezclas de solventes con la esperanza de encontrar alguna mezcla compatible con la RP-HPLC que al mismo tiempo fuera un buen disolvente de proteolípidos (Tabla 5). Ya que el disolvente tradicional de proteolípidos es el CM 2:1, se puso especial interés en las mezclas de solventes con un índice de polaridad idéntico al de éste ($P' = 5.13$). A diferencia de los planteamientos de Snyder, los resultados resumidos en la Tabla 5 sugieren una interpretación distinta respecto a la solubilidad de los proteolípidos. Aunque la mezcla THF/agua 4:1, que disuelve la muestra tan eficazmente como el CM 2:1, tiene un índice de polaridad prácticamente idéntico ($P' = 5.16$), otras mezclas con índices de polaridad diferentes son igualmente efectivos (por ej., THF/etilenglicol 73:27 ó THF/etilenglicol/agua 76:14:10). Además, otras mezclas con idéntico índice de polaridad al del CM 2:1 son incapaces de disolver la muestra (Tabla 5). Parece, pues, que en el caso concreto de los

proteolípidos, las interacciones específicas entre uno u otro tipo de solvente con el soluto es fundamental. En una mezcla de dos solventes determinada, la solubilidad de los proteolípidos varía considerablemente según la polaridad de la misma, esto es, según las proporciones relativas de cada uno de los solventes en la mezcla. Esto está claramente reflejado en la Figura 9 para las mezclas de THF y agua.

El THF es miscible en todas las proporciones con agua y con muchos otros solventes orgánicos, lo cuál permite manejar mezclas dentro de un amplio rango de índices de polaridad. Es así mismo, un excelente disolvente de lípidos, comparable a la mezcla CM 2:1 (Autilio y Norton, 1963 (32)), y quizás esta propiedad pueda influir en la extracción y solubilización de complejos lípido-proteolípido en sus mezclas con agua. Como se demuestra en la Figura 11, las mezclas de THF y agua tienen la capacidad de extraer cantidades significativas de proteína a partir de sustancia blanca de cerebro. La cantidad de proteína extraída depende de la polaridad de la mezcla extractora. La proporción óptima de THF y agua es de 4:1 v/v (80% de THF). Esta mezcla disolvió completamente el extracto crudo proteolipídico liofilizado (Figura 9), alrededor de un 60% de las proteínas totales de mielina (Figura 10a), y el 100% de las proteínas si se incluye ácido (0.1% TFA). Variando las proporciones relativas de THF y agua es posible obtener extractos en los cuáles los proteolípidos o la proteína básica son los constituyentes principales (Figura 10b).

La solubilidad completa de los proteolípidos purificados en un determinado solvente no garantiza que el mismo solvente sea capaz de extraer proteolípidos a partir del tejido (sustancia blanca). Lees (1965 (11)) notó esta discrepancia al comparar la capacidad de extracción de proteolípidos de las mezclas de cloroformo/metanol y tetracloruro de carbono/metanol. Aunque estas últimas disolvieron totalmente un preparado proteolipídico, fueron incapaces de extraer los proteolípidos del tejido cerebral. La Figura 11 muestra que las mezclas de

THF y agua, de hecho, son capaces de extraer los proteolípidos de sustancia blanca en cantidades casi comparables a las de las mezclas de cloroformo y metanol (20% de la proteína total frente a 25%, respectivamente). De nuevo, la composición proteica de los extractos varió cualitativamente con respecto a la polaridad de la mezcla extractora (Figura 11b): mezclas conteniendo entre un 5 y un 20% de agua (P' entre 4.44 y 5.52, respectivamente) extrajeron proteolípidos exclusivamente. Las bandas observables a altos pesos moleculares (HMW) se atribuyen a los agregados proteolipídicos que aparecen durante el proceso de electroforesis. El proteolípido DM-20, que es más hidrofóbico que el PLP, es la especie proteica predominante en el extracto obtenido con la mezcla de menor polaridad ($P' = 4.44$). La proteína básica comienza a ser extraída significativamente con mezclas que contienen alrededor de un 33% de agua en volumen ($P' = 5.80$), y es el componente principal de los extractos obtenidos con la mezcla que contiene un 50% de agua ($P' = 6.66$).

Es significativo que, mezclas de semejante polaridad, extraigan mucha mayor cantidad de proteína básica a partir de mielina (Figura 10b) que a partir de sustancia blanca (Figura 11b). Ello debe estar relacionado con diferencias en el contenido en sales inorgánicas, es decir, con la eliminación de sales de el tejido durante el proceso de purificación de la membrana mielínica. Se ha comprobado que el contenido de iones de un homogenado influye en el rendimiento de proteínas solubles en cloroformo/metanol y en la cantidad de proteína básica que permanece insoluble en ciertas preparaciones de mielina (Lees y Brostoff, 1984 (26)).

Los modificadores orgánicos inicialmente más populares en la técnica de RP-HPLC fueron el metanol y el acetonitrilo, debido a su utilidad en la elución de péptidos. Sin embargo, al aplicar la técnica a proteínas tales como la ovalbúmina o la β -lactoglobulina se comprobó que, al utilizar estos solventes, éstas eluían como picos muy anchos, o incluso no eluían (Potter y Lewis, 1986

(33). Desde entonces, otros modificadores orgánicos de mayor poder eluotrópico han sido preferentemente utilizados para la elución de proteínas, especialmente si éstas son hidrofóbicas. Entre ellos quizás los más ampliamente utilizados son el n-propanol y el isopropanol. Sin embargo, el factor fundamental que determina la idoneidad de una determinada fase móvil es la solubilidad de la muestra. La baja solubilidad de algunas de las proteínas de mielina, especialmente de los proteolípidos, en los solventes comúnmente utilizados en RP-HPLC es uno de los inconvenientes más grandes para aplicar esta técnica a la separación de las proteínas de membrana mielinica. Como se aprecia en la Tabla 5, las mezclas acuosas de n-propanol o de isopropanol no son capaces de disolver el extracto crudo proteolipídico, a diferencia de las mezclas de cloroformo/metanol o THF/agua con idéntico índice de polaridad. Las mezclas acuosas de n-propanol han sido usadas en la separación por RP-HPLC de las proteínas de mielina (Bizzozero et al., 1989 (10)), pero sólo después de una complicada preparación de la muestra, que incluye: delipidación total de la membrana con éter/etanol 3:2 v/v y cromatografía en Sephadex LH-60 con 2-cloroetanol/10 mM HCl 9:1 como fase móvil, y la transferencia de las proteínas delipidadas a la fase móvil de la RP-HPLC mediante diálisis exhaustiva o mediante cromatografía en Sephadex LH-20. Todo ello supone un gran consumo de tiempo y, probablemente, bastante pérdida de proteína durante todos los pasos necesarios para la preparación de la muestra. La gran capacidad solubilizadora de las mezclas acuosas de THF por una parte, junto a la selectividad del THF anhidro para extraer lípidos selectivamente, sin pérdidas sustanciales de proteína, garantizan la solubilidad de las proteínas durante el proceso cromatográfico y reducen considerablemente el tiempo de preparación de la muestra: la delipidación de la membrana mielinica con THF anhidro (seis veces) puede llevarse a cabo fácilmente en tan sólo una hora, con una recuperación de proteína cercana al 90%.

El sistema THF-agua es una de las fases móviles de elección para la disolución y separación de polímeros de estireno sobre columnas de fase reversa (Larmann et al., 1983 (34)). De hecho, el THF es uno de los modificadores orgánicos más frecuentemente utilizados en RP-HPLC (Bakalyar et al., 1977 (35)), aunque nunca se ha aplicado al caso concreto de las proteínas de membrana. Para este fin tiene varias ventajas sobre el n-propanol: su poder eluotrópico es ligeramente mayor, o al menos comparable al del n-propanol o el isopropanol (Melander y Horváth, 1980 (36)); su viscosidad (0.46 cP a 30 °C) es muy inferior a la del n-propanol (1.72 cP) o isopropanol (1.77 cP), con lo cual se evitan los problemas de sobrepresión a que se ven sometidas las columnas con estos solventes, y se alarga su vida útil (Potter y Lewis, 1986 (33)); su punto de ebullición (66 °C) es bastante más bajo que el del n-propanol (97 °C) o isopropanol (82 °C), por lo que es más fácilmente eliminable de las muestras. El THF tiene, así mismo, un límite inferior de transparencia ultravioleta comparable al del n-propanol (210 nm), por lo que es compatible con la detección de las proteínas a 280 nm. A este respecto, sin embargo, cabe mencionar la mayor absorbancia encontrada en el THF de grado HPLC suministrado por algunas marcas comerciales (Probus). Ello se traduce en un aumento de la línea de base conforme avanza el gradiente, y una pérdida de sensibilidad en los picos menos pronunciados. El problema desapareció cuando se utilizó el THF suministrado por Merck (grado Lichrosolv).

El mayor inconveniente que tiene el THF frente a otros modificadores orgánicos es que, por ser un éter, tiende a producir peróxidos durante su almacenamiento cuando, como es el caso del solvente de grado HPLC, carece de antioxidantes. El problema no existe cuando las botellas se almacenan sin haber sido abiertas. Por ello es recomendable utilizar en el cromatógrafo solvente procedente de botellas recientemente abiertas. Si ello no es posible, la redestilación a vacío y temperatura ambiente, en presencia de lentejas de KOH es el

método de elección para eliminar los peróxidos del solvente, antes de ser usado. El contenido en peróxidos en el THF se puede apreciar fácilmente haciendo reaccionar 1 ml de solvente con 0.1 ml de una solución acuosa de yoduro potásico al 10%. La aparición de color amarillo después de un minuto indica la presencia de peróxidos.

Los resultados que se presentan permiten asumir que el THF, usado apropiadamente, puede tener múltiples aplicaciones neuroquímicas: en mezclas con agua, y dependiendo de la polaridad de la mezcla, solubiliza completamente o selectivamente varias especies proteicas de mielina y sustancia blanca. Como se verá en el capítulo V, minimizando el contenido en el medio, es capaz de extraer selectivamente los lípidos de sustancia blanca sin contaminación proteica.

El THF fue propuesto como un solvente alternativo al método convencional del CM 2:1 para la extracción y purificación de gangliósidos (Tettamanti et al., 1973 (37)). Estos autores, sin embargo, no estudiaron el comportamiento de los proteolípidos en sus extractos.

El THF, a causa de sus características físico-químicas intrínsecas (baja densidad y viscosidad, alta miscibilidad con agua y otros solventes orgánicos, bajas constante dieléctrica o polaridad y tensión superficial y, por tanto, alto poder eluotrópico en HPLC de fase reversa) puede ser usado como fase móvil en RP-HPLC (Melander y Horváth, 1980 (36)). Su aplicación a la separación de las proteínas de la membrana mielínica, descrita en este capítulo, han permitido fraccionar de una manera fácil y rápida los componentes proteicos principales de esta membrana, a escalas analítica y semipreparativa: proteína(s) básica(s), fracción Wolfgram y proteolípidos.

El hecho de poder purificar cantidades bastante grandes de proteína a partir de la membrana, en intervalos de tiempo cortos, es especialmente importante para determinadas aplicaciones. Es el caso de los ensayos de reconstitución de las proteínas purificadas en liposomas, o su aplicación a las

terapias alternativas de la esclerosis múltiple, en pleno desarrollo en los últimos años. Entre ellas, destaca la administración oral de antígenos de mielina, como la proteína básica. La administración oral de proteína básica bloquea el posterior desarrollo de encefalitis alérgica experimental en animales de experimentación tras la administración parenteral del antígeno, y en la actualidad se están realizando ensayos similares con pacientes aquejados de esclerosis múltiple (Marx, 1991 (38)).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Agrawal H.C., Hartman B.K., Shearer W.T., Kalmbach S. y Margolis F. (1977). *Purification and immunohistochemical localization of rat brain myelin proteolipid protein*. **J. Neurochem.** 28:495-508.
- 2.- Trotter J.L. y Wegescheide C.L. (1985). *Isolation and purification of myelin proteolipid protein using high speed gel filtration in sodium dodecyl sulfate*. **Neurochem. Res.** 10:865-869.
- 3.- González-Sastre F. (1970). *The protein composition of isolated myelin*. **J. Neurochem.** 17:1049-1056.
- 4.- Skolidis G., Trifilieff E. y Luu B. (1986). *Selective extraction of the DM-20 brain proteolipid*. **J. Neurochem.** 46:297-299.
- 5.- Welling G.W., van der Zee R. y Welling-Wester S. (1987). *Column liquid chromatography of integral membrane proteins*. **J. Chromatogr.** 418:223-243.
- 6.- Shan D.E., Beck C.E., Werrbach-Perez K. y Perez-Polo J.R. (1990). *Reverse-phase high-performance liquid chromatography of nerve growth factor receptor-like proteins identified with monoclonal antibodies*. **J. Neurosci. Res.** 27:620-632.
- 7.- Josic D., Zeilinger K., Reutter W., Böttcher A. y Schmitz. (1990). *High-performance capillary electrophoresis of hydrophobic membrane proteins*. **J. Chromatogr.** 516:89-98.
- 8.- Giegerich G., Pette M., Fujita K., Wekerle H., Epplen J.T. y Hinkkanen A. (1990). *Rapid method based on reversed-phase high-performance liquid chromatography for purification of human myelin basic protein and its thrombic and endoproteinase Lys-C peptides*. **J. Chromatogr.** 528:79-90.
- 9.- Shimamura M., Ohara T., Imazawa M. y Miyamoto K. (1990). *Purification of myelin-associated glycoprotein from calf brain using high-performance liquid chromatography*. **J. Chromatogr.** 526:535-539.
- 10.- Bizzozero O.A., Odykirk T.S., McGarry J.F. y Lees M.B. (1989). *Separation of the major proteins of central and peripheral nervous system myelin using reversed-phase high-performance liquid chromatography*. **Anal. Biochem.** 180:59-65.

- 11.- Lees M.B. (1965). *The solubility properties of proteolipids*. **Ann. NY Acad. Sci** 122:116-127.
- 12.- Folch J., Lees M. y Sloane-Stanley G. (1957). *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. **J. Biol. Chem.** 226:497-509.
- 13.- Monreal J. (1975). *Chromatographic fractionation of brain white matter proteolipid*. **J. Neurochem.** 25:539-541.
- 14.- Aguilar J.S., de Cózar M., Criado M. y Monreal J. (1982). *Method for lyophilizing brain proteolipid preparations that increases subsequent solubilization by detergents*. **J. Neurochem.** 39:1733-1736.
- 15.- Oshiro y Eylar (1970). *Allergic encephalomyelitis: a comparison of the encephalitogenic AI protein from human and bovine brain*. **Arch. Biochem. Biophys.** 138:606-613.
- 16.- Gow A. y Smith R. (1989). *The thermodynamically stable state of myelin basic protein in aqueous solution is a flexible coil*. **Biochem. J.** 257:535-540.
- 17.- Kurihara T., Nussbaum J. y Mandel P. (1970). *2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in purified myelin from brains of Jimpy and normal young mice*. **Life Sci.** 10:421-429.
- 18.- Snyder L.R. (1974). *Classification of the solvent properties of common liquids*. **J. Chromatogr.** 92:223-230.
- 19.- Laemmli U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. **Nature** 227:680-685.
- 20.- Gottlieb M. y Chavko M. (1987). *Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels*. **Anal. Biochem.** 165:33-37.
- 21.- Vitiello F. y Zanetta J.P. (1978). *Thin-layer chromatography of phospholipids*. **J. Chromatogr.** 166:637-640.
- 22.- Bizzozero O., Besio-Moreno M., Pasquini J.M., Soto E.F. y Gómez C.J. (1982). *Rapid purification of proteolipids from rat brain subcellular fractions by chromatography on a lipophilic dextran gel*. **J. Chromatogr.** 227:33-44.
- 23.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. **J. Biol. Chem.** 193:265-275.

- 24.- Ames B.N. y Dubin D.T. (1960). *The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid*. **J. Biol. Chem.** 235:769-775.
- 25.- Folch-Pi J. y Stoffyn P.J. (1972). *Proteolipids from membrane systems*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 195:86-107.
- 26.- Lees M.B. y Brostoff S.W. (1984). *Proteins of myelin*. En (P. Morell, ed.): **Myelin**, 2nd edition. Nueva York, Plenum Press. Pp: 197-224.
- 27.- Nice E.C., Capp M.W., Cooke N. y O'Hare M.J. (1981). *Comparison of short and ultrashort-chain alkylsilane-bonded silicas for the high-performance liquid chromatography of proteins by hydrophobic interaction methods*. **J. Chromatogr.** 218:569-580.
- 28.- Cheifetz y Moscarello (1985). *Effect of bovine basic protein charge microheterogeneity on protein-induced Aggregation of unilamellar vesicles containing a mixture of acidic and neutral phospholipids*. **Biochemistry** 24:1909-1914.
- 29.- Cochary E.F., Bizzozero O.A., Sapirstein V.S., Nolan Ch.E. y Fischer I. (1990). *Presence of the plasma membrane proteolipid (plasmolipin) in myelin*. **J. Neurochem.** 55:602-610.
- 30.- Kerlero de Rosbo N., Tsang S., Bernard C.C.A. (1991). *Comparative study of myelin basic protein isoforms in developing vertebrate central nervous system: absence of 21.5- and 20.2-Kilodalton myelin basic proteins in chicken may point to their importance in mammalian myelinogenesis*. **Dev. Neurosci.** 13:34-40.
- 31.- Wood D.D. y Moscarello M.A. (1989). *The isolation, characterization, and lipid-aggregating properties of a citrulline containing myelin basic protein*. **J. Biol. Chem.** 264:5121-5127.
- 32.- Autilio L.A. y Norton W.T. (1963). *Non-aqueous solvent extracts of lyophilized bovine brain white matter*. **J. Neurochem.** 10:733-738.
- 33.- Potter R.L. y Lewis R.V. (1986). *Reversed-phase chromatography of proteins and nucleic acids: practical considerations*. En (C. Horváth, ed): **High-performance liquid chromatography -Advances and Perspectives**, vol. 4. Academic Press, Nueva York. Pp: 1-44.
- 34.- Larman J.P., DeStefano J.J., Goldberg A.P., Stout R.W., Snyder L.R. y Stadalius M.A. (1983). *Separation of macromolecules by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Pore-size and surface-area*

effects for polystyrene samples of varying molecular weight. J. Chromatogr. 255:163-189.

- 35.- Bakalyar S.R., McIlwrick R., Roggendorf E. (1977). *Solvent selectivity in reversed-phase high-pressure liquid chromatography. J. Chromatogr.* 142:353-365.
- 36.- Melander W.R. y Horváth C. (1980). *Reversed-phase chromatography*. En (Horváth C., ed.): **High-Performance Liquid Chromatography**. Orlando, Academic Press. Pp: 113-319.
- 37.- Tettamanti G., Bonali F., Marchesini S. y Zambotti V. (1973). *A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. Biochim. Biophys. Acta* 296:160-170.
- 38.- Marx J. (1991). *Testing of autoimmune therapy begins. Science* 252:27-28.

CAPITULO IV

SOLUBILIZACION Y PURIFICACION DE LAS PROTEINAS DE MIELINA CON DETERGENTES

INTRODUCCION

La peculiar organización multilamelar de la membrana mielínica, su particular composición bioquímica, y las fuertes interacciones proteína-proteína y lípido-proteína que tienen lugar entre sus componentes contribuyen notablemente a la gran estabilidad y resistencia a la desorganización observadas en esta membrana (Sedzik et al., 1984 (1); Pereyra et al., 1988 (2); Kosaras y Kirschner, 1990 (3)). Ello se traduce en una mayor dificultad en su solubilización con detergentes, en comparación con otras biomembranas. Por este motivo, aunque la solubilización de algunos componentes de mielina ha sido tratada anteriormente (Eng et al., 1968 (4); McIlwain et al., 1971 (5); Aguilar et al., 1982 (6)), y existe información cubriendo algunos aspectos de este problema en varios artículos publicados en los últimos quince años, tal información es todavía fragmentaria. No se dispone de un estudio comparativo de los detergentes más comúnmente empleados en la bioquímica de membranas (Jones et al., 1987 (7)), en las mismas condiciones de fuerza iónica, pH y temperatura, especialmente en el caso de aquéllos que han sido utilizados con éxito en la reconstitución de proteínas funcionalmente activas y, que por tanto, son *a priori* no desnaturalizantes.

Por este motivo, en este capítulo se compara la capacidad de un total de ocho detergentes para disolver los componentes de la mielina en distintas condiciones de fuerza iónica, temperatura y pH. Este estudio se llevó a cabo con el doble objetivo de establecer, por una parte, las condiciones de máxima solubilización de la membrana con el mínimo impacto sobre la estructura de sus proteínas, y por otra, el de examinar la capacidad de algunos detergentes para solubilizar selectivamente algunos componentes lipídicos y proteicos, con el fin de purificar de una manera rápida y sencilla los proteolípidos. Esta última estrategia ha sido de especial utilidad para la purificación de otras proteínas

intrínsecas (Helenius y Simons, 1975 (8)), como por ejemplo la bacteriorrodopsina (Szundi y Stoeckenius, 1987 (9); Seigneuret et al., 1991 (10)).

Para facilitar la comprensión de todos los resultados, este capítulo se ha dividido en dos partes. En la primera parte se detalla el estudio comparativo de solubilidad, se establecen las condiciones óptimas de solubilización, se analizan, por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), los efectos del detergente más eficaz de los estudiados para los propósitos de esta tesis, el octilglucósido, sobre la estructura secundaria de los componentes proteicos de la mielina, y se establecen las bases de un protocolo de reconstitución rápido y sencillo. En la segunda parte se optimiza la purificación de los proteolípidos explotando la propiedad de uno de los detergentes estudiados, el CHAPS, para extraer selectivamente los lípidos y las proteínas periféricas (proteína básica). Se caracteriza, además, el estado oligomérico de los proteolípidos purificados por cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión por tamaño (SE-HPLC).

PRIMERA PARTE: *Solubilización de la membrana mielínica de SNC con detergentes. Efecto del octilglucósido sobre la estructura secundaria de las proteínas de mielina, estudiado por FT-IR*

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El agua utilizado en todos los experimentos procedió de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore). La sacarosa y la N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) se adquirió de BDH, y el fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF), la acrilamida, la N,N'-metilenbisacrilamida, el persulfato amónico, la glicina, el ácido tricloroacético (TCA) y el Coomassie Brilliant Blue R-250 fueron de Merck. Los detergentes que se utilizaron fueron de las siguientes compañías: Calbiochem (N-octil β -D-glucopiranosido (OG) y colato); Serva (CHAPS y Zwittergent 3-14); Sigma (Lubrol PX y OG); Merck (SDS) y BDH (Triton X-100). Hay que reseñar que algunos tampones como el HEPES (Sigma) o el Tris (Merck) interfieren con las determinaciones de proteína por el método de Lowry et al. (1951 (11)), aunque no con las lecturas de absorbancia a 280 nm. El tampón fosfato fue muy adecuado para la cuantificación de proteína por cualquiera de estos procedimientos, pero sin embargo interfiere con las determinaciones de fósforo lipídico, para las cuales el Tris o el HEPES fueron inocuos. Todos los detergentes utilizados, a concentraciones relativamente altas, mostraron cierta absorbancia de fondo a 280 nm. Algunos, como el Triton X-100, no pueden ser usados a esta longitud de onda, y otros como el CHAPS interfieren con la determinación de proteína por el método de Lowry et al. (1951 (11)), dando color azul por la propia naturaleza química de este detergente.

Purificación de la membrana mielínica

La mielina se purificó a partir de sustancia blanca de cerebro bovino como se describe en el capítulo II. Para los propósitos descritos en el presente capítulo, no se observaron diferencias entre la mielina congelada y la mielina liofilizada. Por su mayor facilidad de manipulación se utilizó, preferentemente,

material liofilizado.

Ensayos de solubilización

Las preparaciones de mielina purificada se suspendieron, y los detergentes se disolvieron, en las soluciones tampón indicadas en cada caso. Para estudiar el efecto de la concentración del detergente sobre la solubilización de la mielina, se distribuyeron alicuotas de las soluciones de detergente en tubos de centrífuga, se completó el volumen a 0.5 ml con el tampón correspondiente, y luego un volumen constante de suspensión de mielina (0.5 ml, conteniendo 1 mg de proteína total) se añadió a cada tubo. Todas las muestras se incubaron durante 30 minutos y agitación constante en tubos tapados, a la temperatura indicada en cada caso. Luego se centrifugaron, a la misma temperatura que en la incubación, durante 30 minutos a 100000 g ó durante 60 minutos a 50000 g. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se colectaron para el análisis de proteína. En algunos casos, también se analizó su contenido en fósforo (Ames and Dubin, 1960 (12)) y colesterol (Siedel et al., 1981 (13)). El efecto de la concentración de sales en el medio, en presencia de proporciones constantes de detergente y mielina, así como el efecto de la variación de la concentración de membrana en presencia de una cantidad constante de detergente y sal, se analizaron utilizando protocolos similares. La proteína se cuantificó utilizando una modificación (Aguilar et al., 1982 (6)) del método de Lowry et al. (1951 (11)), destinada a disminuir las interferencias producidas por la presencia de detergentes. El color de fondo debido al Tris se corrigió utilizando blancos con este tampón.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La composición de las proteínas solubilizadas con cada detergente se analizó por SDS-PAGE. Tras incubar 1 mg de proteína de mielina por ml de detergentes 60 mM a 23 °C, el material solubilizado se separó del residuo

insoluble por ultracentrifugación, como se ha descrito. Las proteínas disueltas en el sobrenadante se precipitaron con TCA al 10% (concentración final) a 4°C durante 60 minutos, se centrifugaron a 40000 g durante 20 minutos, se disolvieron en solución de SDS al 3% en Na₂CO₃ al 1%, y se dializaron extensivamente frente al tampón de muestras para la electroforesis (SDS al 4% en Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8). Los residuos insolubles en cada detergente ensayado se disolvieron directamente en solución de SDS al 3% en Na₂CO₃ al 1%, y se dializaron como antes. A todas las muestras se les añadió glicerol (10%) y azul de bromofenol (10 µg/ml). El desarrollo de los geles (7 x 8 cm, 0.75 mm de grosor) se realizó de acuerdo a Laemmli (1970 (14)), usando un gradiente de concentración de acrilamida desde el 5% al 17%. El tampón de desarrollo de la electroforesis fue Tris 0.025 M, glicina 0.2 M, SDS 0.1 %, pH 8.3. Las muestras, conteniendo entre 10 y 50 µg de proteína, se cargaron sobre un gel concentrador (*stacking gel*) de acrilamida al 3%. Se utilizó una unidad vertical *Migthy Small II* (Hoeffer Scientific Instruments), con una corriente de 3 mA, hasta que el azul de bromofenol llegó hasta la parte inferior del gel (aproximadamente una hora). Los geles se tñieron toda la noche con Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.25%, disuelto en metanol/agua/ácido acético glacial 45:45:5, por volumen) y se destñeron con metanol/agua/ácido acético glacial 27:64:9, por volumen. Como proteínas de referencia, de pesos moleculares conocidos, se usaron: fosforilasa b, seroalbúmina bovina, ovalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de soja y alfa-lactalbúmina (94, 67, 43, 30, 20.1 y 14.4 KDa, respectivamente), adquiridas a Pharmacia.

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Se estudió el efecto del OG sobre la estructura secundaria de las proteínas de mielina, así como la capacidad de este detergente para reemplazar el entorno hidrofóbico que los lípidos proporcionan a las proteínas. Para ello, 100 µl de

membrana mielínica purificada (3.2 mg de proteína total) se trataron con 1.3 ml de THF. Se agitó en *vortex* y se centrifugó (15 minutos a máxima velocidad en una *microfuge* Beckman). Se desechó el sobrenadante, y el precipitado (constituido por las proteínas delipidadas) se interpuso, con la ayuda de un mortero de ágata, con 200 μ l de tampón fosfato sódico 0.1M, sulfato sódico 0.1 M, pH 6.7 conteniendo cantidades crecientes de OG, para alcanzar relaciones OG/proteína (en peso) desde 0 hasta 8.78 mg/mg. Las muestras se introdujeron entre cristales de CaF_2 , con una longitud media de paso de 10 μ m, y se analizaron en un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (Perkin-Elmer, modelo 1725X), conectado a un ordenador personal (Epson PC AX2). De cada muestra se hicieron 64 barridos en el rango de 1300-1900 cm^{-1} , y otros tantos de su correspondiente blanco (el tampón en el que va suspendida la muestra). Se obtuvieron los espectros diferencia, restando el espectro promedio del blanco al espectro promedio de la muestra, con la ayuda del *software* del ordenador.

Los datos cuantitativos de estructura secundaria se calcularon a partir de los espectros diferencia, utilizando un programa de ajuste de curvas para la resolución de perfiles espectrales complejos (Raso et al., 1987 (15)). El programa trabaja con un algoritmo que utiliza el criterio de los mínimos cuadrados, e incluye cuatro funciones teóricas de ajuste: Gauss, Lorentz, Gauss-Lorentz y la función asimétrica log-normal. El algoritmo descompone el perfil espectral en la suma de curvas definidas, cuya área se calcula por integración. Los porcentajes de estructuras alfa y beta se calcularon aplicando el algoritmo a la banda de frecuencias amida I. Para el porcentaje de estructuras alfa-helicoidales se utilizó la frecuencia de 1652 cm^{-1} . Las estructuras en lámina β antiparalela se calcularon a partir de la frecuencia de 1633 cm^{-1} . El porcentaje de estructura desordenada se calculó como la diferencia entre 100 y la suma de estructuras alfa y beta.

Microscopía electrónica (secciones ultrafinas)

Se llevó a cabo por el procedimiento detallado en el capítulo II (ver Pág. 81).

RESULTADOS

Solubilización comparativa de los componentes de mielina en varios detergentes

La Figura 23 muestra la estructura química de los ocho detergentes utilizados en este capítulo para solubilizar los componentes de la membrana mielínica purificada: tres de ellos (Lubrol PX, Triton X-100, OG) son de carácter no iónico, tres son aniónicos (colato, DOC, SDS), y dos son zwitteriónicos (CHAPS, Zwittergent 3-14). En la Tabla 6 se muestran algunos parámetros que pueden ser útiles para comprender el comportamiento de cada surfactante, especialmente la concentración micelar crítica (CMC).

La solubilización de los componentes lipídicos y proteicos de la mielina se vio muy afectada por el tipo y la concentración del detergente utilizado (Figura 24). Los detergentes no iónicos OG y Lubrol PX fueron significativamente más efectivos en la solubilización de la proteína que los dos detergentes derivados de las sales biliares colato y CHAPS. La extracción de fosfolípidos totales y colesterol también dependió del detergente utilizado y de su concentración. En todos los casos, sin embargo, los fosfolípidos se extrajeron con mayor facilidad que el colesterol, y los esfingolípidos fueron, de todos, los más insolubles: los lípidos residuales, insolubles, tras tres extracciones secuenciales de la mielina con OG 30 mM están compuestos muy mayoritariamente por cerebrósidos, sulfátidos y esfingomielina, así como restos de colesterol. De hecho, el colesterol puro fue escasamente soluble en estos detergentes, lo cual sugiere que en el caso de la mielina, los fosfolípidos endógenos facilitan su solubilización. Estos resultados son consistentes con los publicados para el caso de la extracción de mielina con Triton X-100 (Gillespie et al., 1989 (16)).

Efecto de la temperatura

A concentraciones comparables de un determinado detergente, la

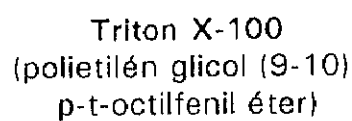
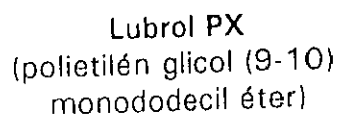
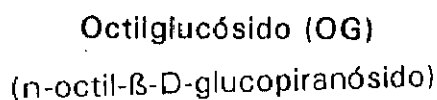
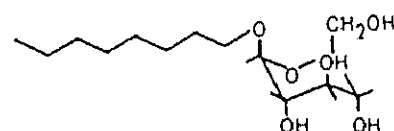
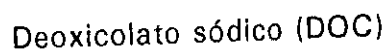
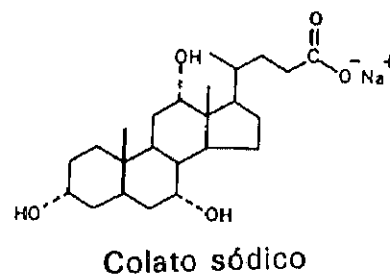
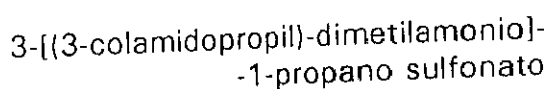
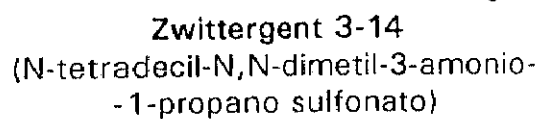
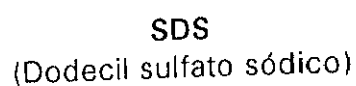


Figura 23.- Estructura química de los detergentes utilizados en este capítulo.

TABLA 6

Aspectos comparativos de los detergentes utilizados en este estudio

Detergente	<u>mmol/L para alcanzar:</u>			<u>g/100 ml para alcanzar:</u>	
	PM	CMC	Solución 1%	CMC	Solución 30 mM
OG	292.4	25.0	34.2	0.731	0.877
Lubrol PX	582.0	0.1	17.2	0.006	1.746
Triton X-100	624.9	0.2	15.9	0.015	1.875
Colato Na	430.9	14.0	23.2	0.603	1.292
DOC	414.9	5.0	24.1	0.207	1.245
CHAPS	614.9	8.0	16.3	0.492	1.845
Zwitt. 3-14	364.0	0.3	27.5	0.011	1.092
SDS	288.5	8.3	34.7	0.239	0.866

Abreviaciones usadas: PM, peso molecular; CMC, concentración micelar crítica; Zwitt. 3-14, Zwittergent 3-14; Colato Na, colato sódico.

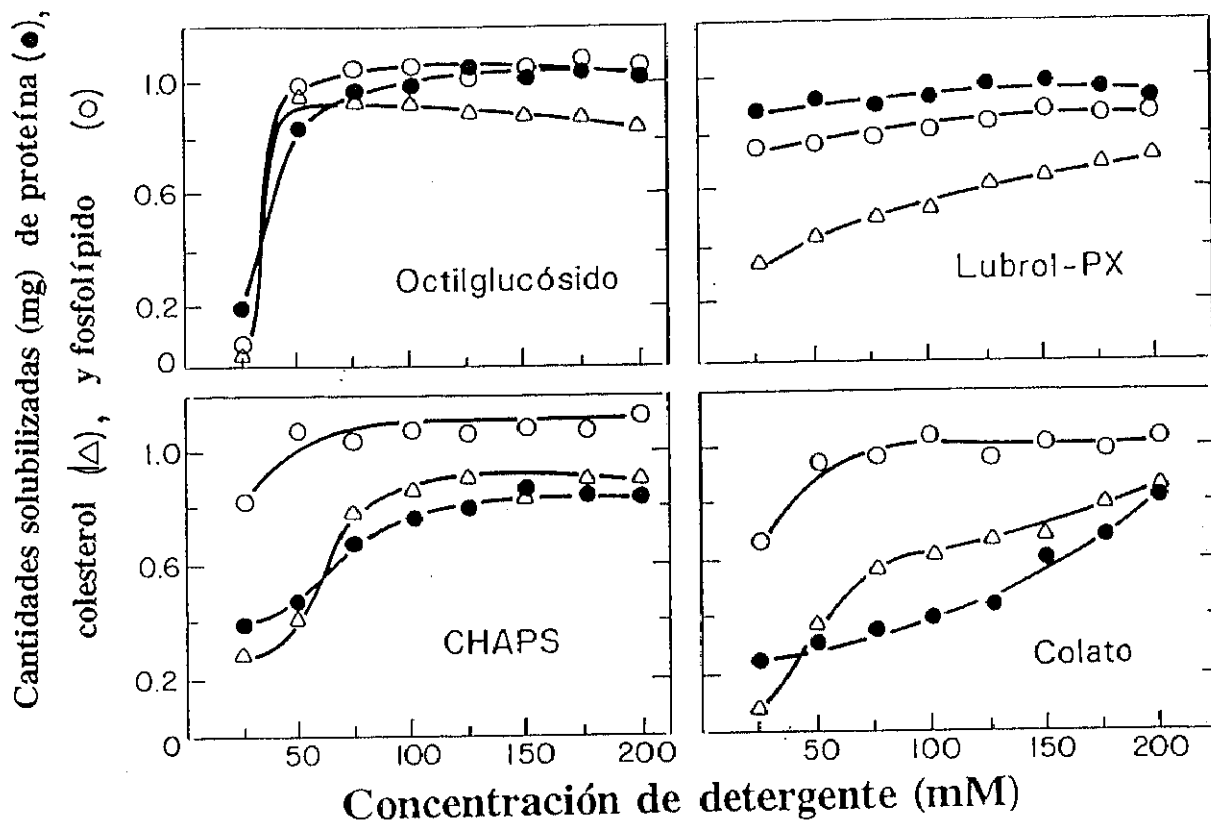


Figura 24.- Solubilización de los componentes de la mielina con dos detergentes no iónicos y con dos detergentes relacionados con las sales biliares. Las muestras de mielina, conteniendo 1 mg de proteína, se incubaron a 23 °C durante 30 minutos con 1 ml del detergente indicado, disuelto en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, conteniendo NaCl 0.15 M. Se centrifugó a 100.000 g durante 30 minutos, y se analizaron los componentes indicados en alícuotas de los sobrenadantes.

temperatura fue una importante variable que afectó el proceso de solubilización de los componentes de la membrana. El efecto fue más pronunciado para los detergentes no iónicos que para el resto de los detergentes, y se ilustra en la Figura 25 para el OG. Un aumento en la temperatura, a concentración constante de OG, produce un efecto similar sobre la solubilización que un aumento en la concentración a temperatura constante. Así, utilizando una suspensión de 3 mg de mielina/ml, la mitad de la proteína total fue soluble a 23 °C con OG 25 mM, mientras que para disolver una proporción equivalente de proteína a 0-4 °C, se requirió una concentración 60 mM del mismo detergente. Las bajas temperaturas provocaron un efecto interesante sobre las proteínas: mientras que las altas concentraciones de OG disuelven los fosfolípidos y el colesterol completamente a ambas temperaturas, aproximadamente el 10% de la proteína permaneció insoluble, a 4 °C, con concentraciones de hasta 200 mM de OG. Así, aunque la solubilización de los tres componentes fue dependiente de la temperatura, la de la proteína fue la más afectada.

Efecto de la fuerza iónica del medio

Otro factor relevante en la solubilización de la membrana fue la presencia de sales. Cuando se realizaron curvas similares a las mostradas en las Figuras 24 y 25, utilizando tampones orgánicos (Tris ó HEPES) sin sales, se requirieron concentraciones muy superiores de detergente para alcanzar porcentajes de solubilización proteica comparables. Esto se observó para todos los surfactantes ensayados, y se ilustra en la Figura 26 para el caso del OG. En presencia de sales, los detergentes se comportaron como si estuvieran en mayores concentraciones, esto es, con mayor eficacia. El medio de solubilización utilizado en las Figuras 24 y 25 contenía cloruros, porque se llevó a cabo el análisis de fósforo lipídico en los sobrenadantes, pero otros aniones, tales como fosfato o sulfato pueden reemplazarlos ventajosamente en el medio de solubilización. Una mezcla

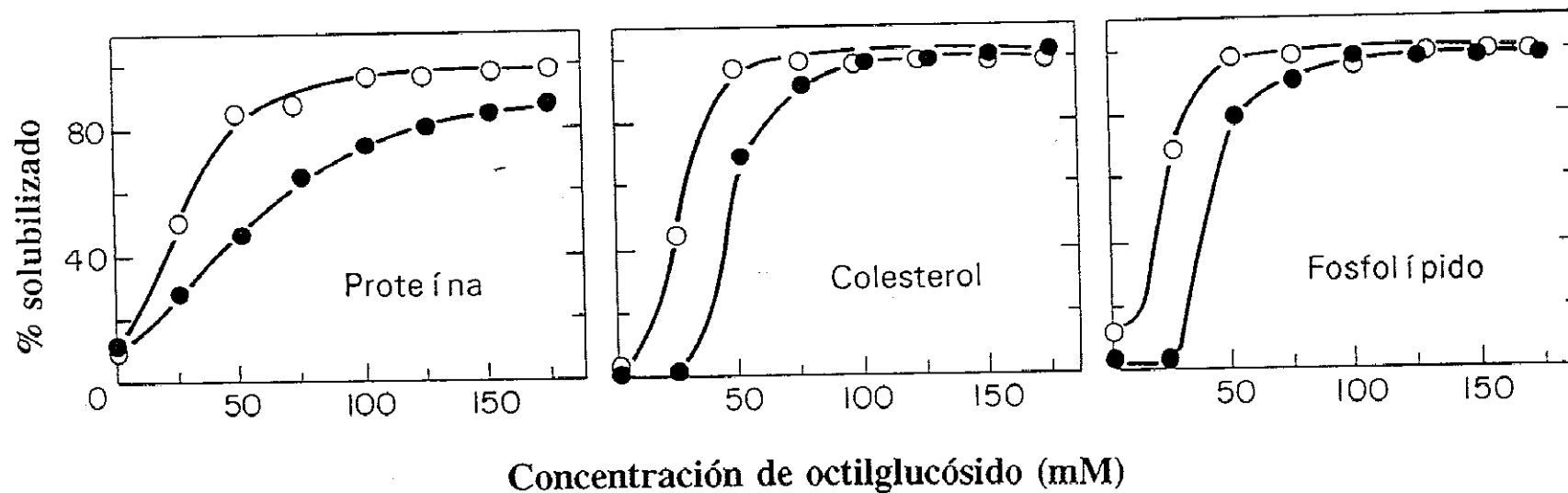


Figura 25.- Efecto de la temperatura en la solubilización de los componentes de mielina por el octilglucósido. Las muestras, conteniendo 1 mg de proteína, se incubaron con 1 ml de las concentraciones indicadas de OG en tampón Tris-glicina-HCl 0.2 M, pH 7.4, durante 30 minutos a 23 °C (símbolos blancos) ó a 0-4 °C (símbolos negros). Luego se centrifugaron a la temperatura correspondiente, y se analizaron los componentes solubilizados en alícuotas de los sobrenadantes.

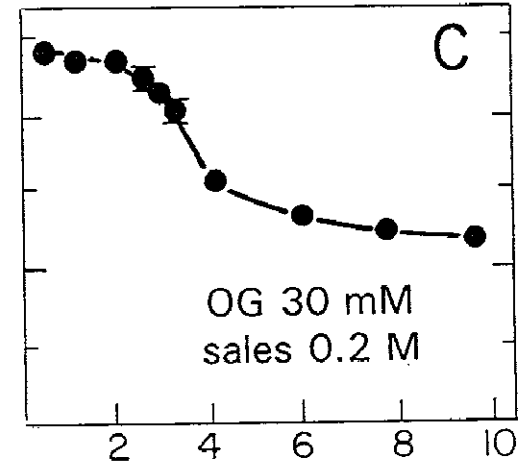
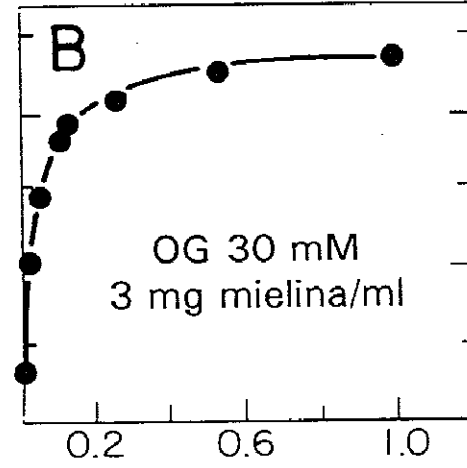
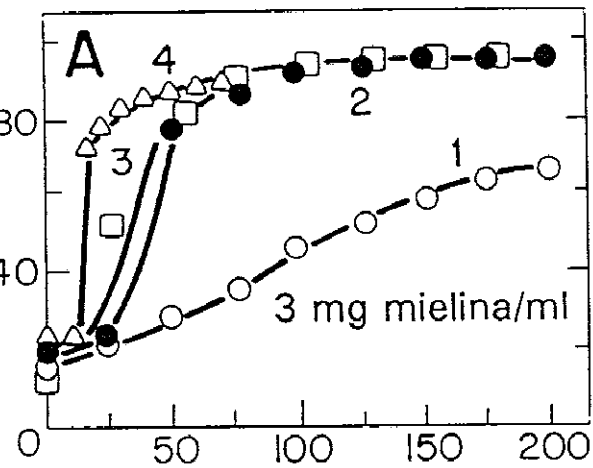
muy adecuada resultó ser el tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 6.7 conteniendo sulfato sódico 0.1 M. Esta combinación de sales ha sido usada para solubilizar y separar cromatográficamente otras proteínas de membrana (DeLucas y Muccio, 1984 (17); Muccio y DeLucas, 1985 (18)), y se consideró importante el probarla en vista de futuros experimentos de SE-HPLC. En el caso del OG, la cantidad requerida para mantener la misma cantidad de proteína en solución fue especialmente baja en esta combinación de sales (Figura 26A). Así, el 90% de la proteína total se solubilizó con tan sólo una concentración 30 mM, en contraste con la concentración de 200 mM requerida para obtener una solubilización de proteína del 70% cuando las sales no estuvieron presentes.

En la Tabla 7 se compara el efecto de una concentración 30 mM de siete detergentes sobre la solubilización de una cantidad constante de proteína de mielina en dos medios distintos, en tampón Tris o en tampón fosfato sódico 0.1M, pH 6.7 conteniendo sulfato sódico 0.1M. Para todos los detergentes se observó una gran mejoría en este último medio, particularmente en el caso del OG. La Figura 27 muestra los perfiles de solubilización como una función de la concentración del detergente en este último medio salino. Los surfactantes más efectivos fueron el SDS y el Zwittergent 3-14 (aniónico y zwitteriónico, respectivamente), seguidos por dos detergentes no iónicos, el Lubrol PX y el OG. A éstos les siguieron el CHAPS y el Triton X-100, menos efectivos para los presentes propósitos, y el último fue el colato sódico. Este detergente no tuvo utilidad en este medio salino en concreto, porque se insolubiliza y precipita en poco tiempo.

Tras los tratamientos con concentraciones relativamente altas de detergentes, disueltos en tampón fosfato sódico 0.1 M, sulfato sódico 0.1 M, pH 6.7, se observó que los pequeños residuos insolubles de material no solubilizado aparecen muy enriquecidos en proteínas de la fracción Wolfgram, pero sólo cuando la solubilización se ha llevado a cabo con los tres detergentes no iónicos

Figura 26.- Solubilización de las proteínas de mielina con octilglucósido. Se muestran los efectos de la variación de la concentración del detergente en cuatro tampones acuosos diferentes (A), de la variación de la concentración salina del medio en presencia de una concentración constante de detergente y membrana (B), y de la variación de la concentración de membranas a una concentración constante de detergente y sales (C). En A, los tampones utilizados fueron los siguientes: (1), HEPES 20 mM, pH 7.4; (2), Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 conteniendo NaCl 0.15 M; (3), Tris-glicina-HCl 200 mM, pH 7.4; y (4), fosfato sódico 0.1 M, pH 6.7, conteniendo sulfato sódico 0.1 M. En B y C, el término "sales" se refiere a la mezcla equimolar de fosfato sódico y sulfato sódico (por ej., sales 0.2 M = fosfato sódico 0.1 M + sulfato sódico 0.1 M). Todas las incubaciones se realizaron a 23 °C durante 30 minutos.

Proteína solubilizada (%)



Concentración de OG (mM)

Concentración de sales (M)

mg mielina/ml

TABLA 7

Efecto de la presencia de sales en la solubilización de las proteínas de mielina por detergentes.

Detergente	Sin sales	Con sales	Aumento
Ninguno	25 ± 3	141 ± 20	5.6
OG	145 ± 25	775 ± 9	5.3
Lubrol PX	536 ± 25	840 ± 9	1.6
Triton X-100	290 ± 14	623 ± 31	2.1
Colato sódico	45 ± 10	158 ± 20	3.5
CHAPS	95 ± 10	431 ± 19	4.5
Zwittergent 3-14	425 ± 5	875 ± 26	2.1
SDS	437 ± 19	934 ± 32	2.1

Se prepararon suspensiones de membrana mielínica purificada, utilizando agitación magnética, en tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0 ó en tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 6.7, conteniendo sulfato sódico 0.1 M. Se prepararon soluciones de cada detergente en los dos medios, y se combinaron con la suspensión de mielina equivalente, para obtener una concentración final de proteína próxima a 1 mg/ml (933 µg/ml), y una concentración final de detergente de 30 mM. Tras incubar a 23 °C durante 30 minutos, se centrifugaron las muestras y se determinó la proteína disuelta en los sobrenadantes (ver Materiales y Métodos). Los resultados se expresan como µg de proteína total/ml (media ± desviación estándar de tres experimentos diferentes). El término "sin sales" se refiere a los experimentos llevados a cabo con tampón Tris-HCl 0.1 M. El término "con sales" se refiere a los experimentos llevados a cabo con tampón fosfato sódico 0.1 M, sulfato sódico 0.1 M.

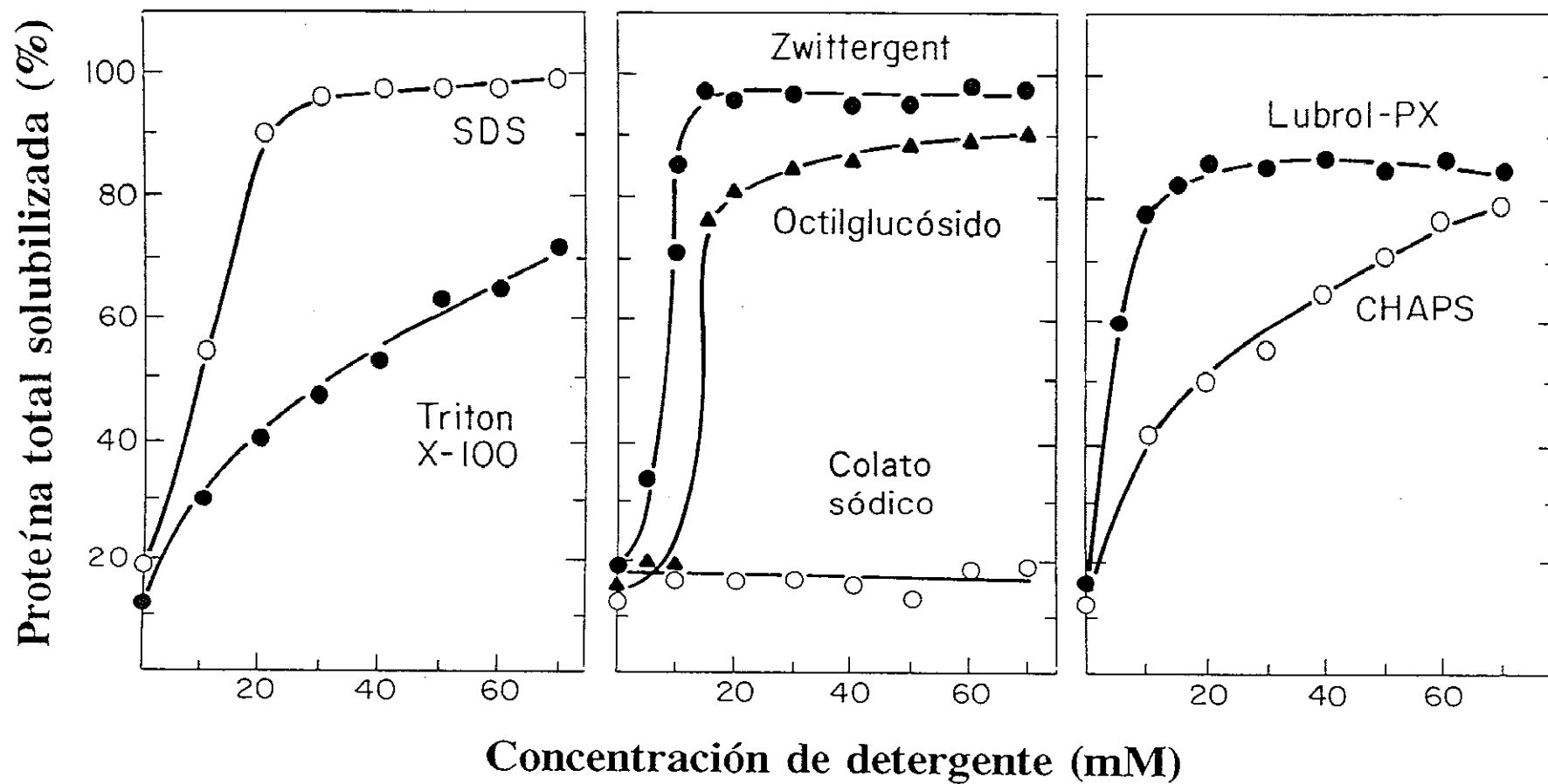
o el CHAPS (Figura 28). Tales proteínas estuvieron ausentes en los tubos en los cuáles la solubilización se llevó a cabo con SDS o Zwittergent 3-14. Los sobrenadantes de los tres detergentes no iónicos y el CHAPS, además, carecen de este grupo de bandas, detectándose únicamente las bandas correspondientes a proteolípidos, proteína básica y agregados proteolipídicos de alto peso molecular.

Estructura secundaria de las proteínas en detergente

El impacto que el OG ejerce sobre la estructura secundaria de las proteínas de mielina se analizó por FT-IR. La Figura 29 muestra los espectros diferencia de la mielina purificada (control, espectro superior), y de la mielina delipidada, suspendida en tampón fosfato sódico 0.1 M, sulfato sódico 0.1 M pH 6.7 conteniendo cantidades crecientes de OG. La determinación de estructura secundaria de proteínas globulares por espectroscopía infrarroja se basa, principalmente, en la intensidad de absorción de las frecuencias dentro de la banda amida I. La frecuencia de 1652 cm^{-1} es indicativa de estructura alfa-helicoidal; la frecuencia de 1633 cm^{-1} indica estructuras en lámina β antiparalela. La estructura desordenada (*random coil*) aparece hacia 1655 cm^{-1} (Amey y Chapman, 1983 (19)).

El trazo superior de la Figura 29 muestra el espectro diferencia de la mielina purificada. El máximo de absorción de la banda amida I, a 1652 cm^{-1} , indica que la conformación media principal de las proteínas en su estado nativo es la estructura alfa-helicoidal, aunque también son visibles las estructuras en lámina β , que producen un hombro a la frecuencia de 1633 cm^{-1} . La cuantificación de estas estructuras, como se describe en Materiales y Métodos, dio los siguientes resultados: 51% de estructura alfa-helicoidal, 29% de estructura en lámina β antiparalela y 20% de estructura desordenada. Cuando se eliminan los lípidos de la membrana, y las proteínas delipidadas se suspenden en tampón

Figura 27.- Solubilización de proteína a partir de muestras de mielina incubadas con siete detergentes distintos, disueltos en tampón fosfato sódico 0.1 M, sulfato sódico 0.1 M, pH 6.7. Cada muestra de mielina contenía 1 mg de proteína total, y se incubó durante 30 minutos, a 23 °C, con 1 ml de detergente a las concentraciones indicadas. Tras centrifugar, se analizó proteína en los sobrenadantes. El trazo observado para el colato sódico se debe a que este detergente tiende a precipitar en el tampón utilizado.



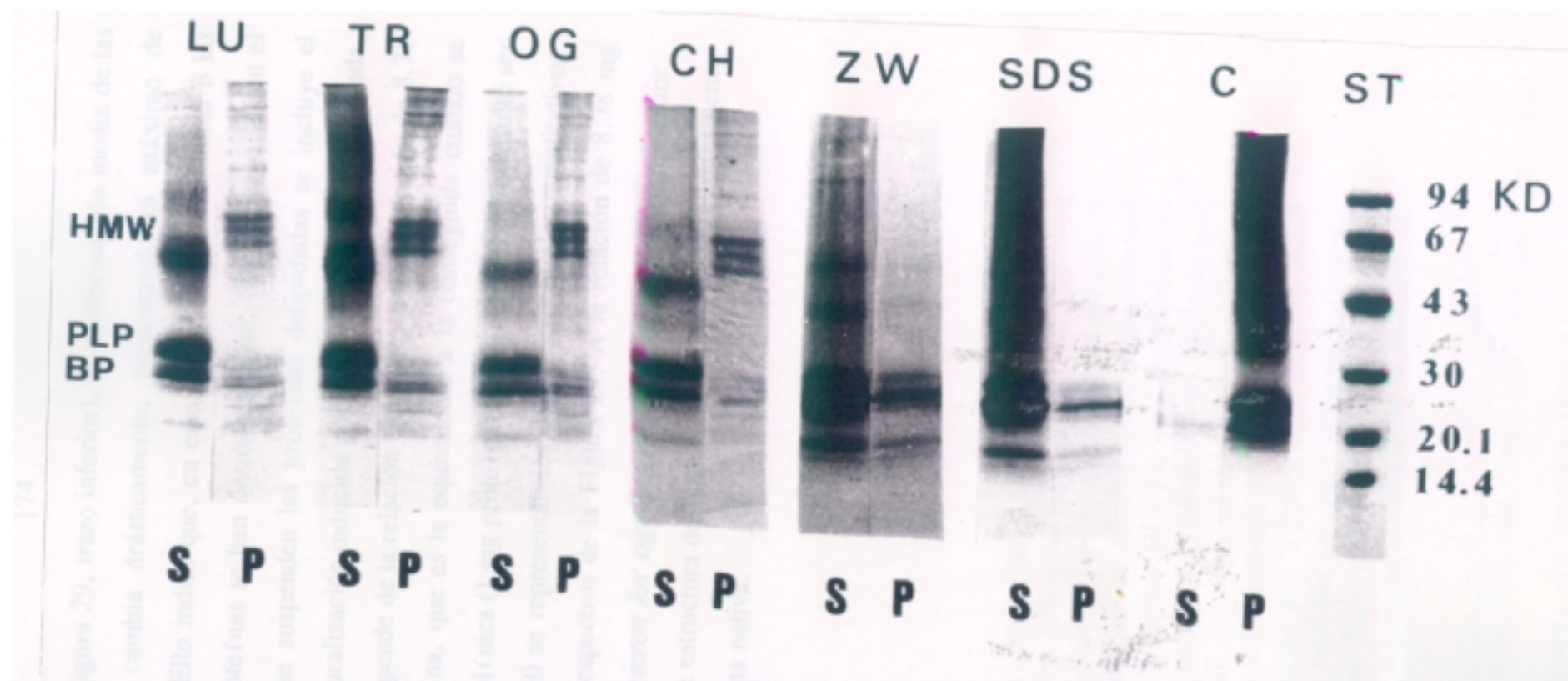
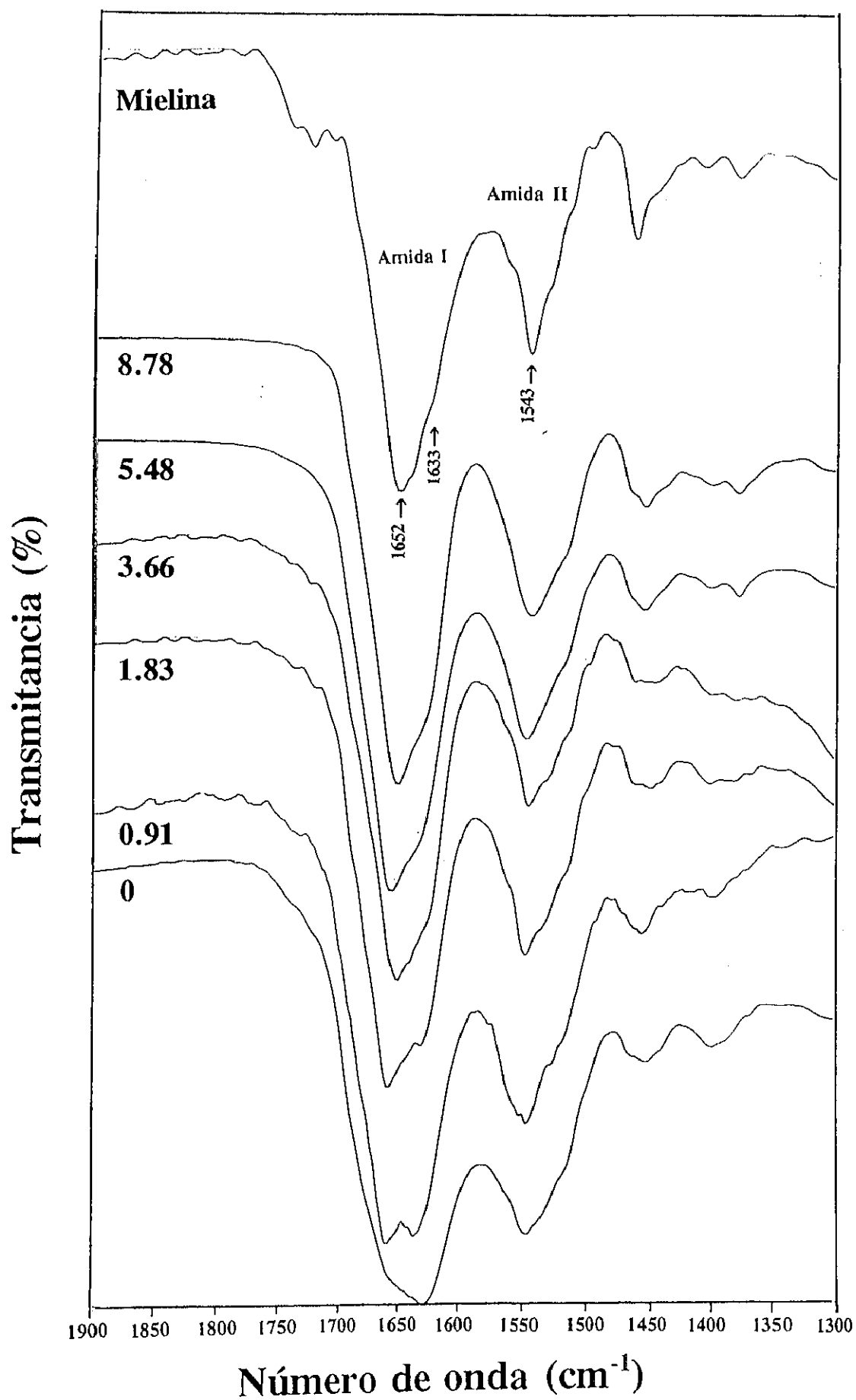


Figura 28.- Distribución de las proteínas de mielina, para cada detergente, en los sobrenadantes (S) y precipitados (P), analizados por SDS-PAGE. La mielina se extrajo con una concentración 60 mM de cada detergente en tampón fosfato sódico 0.1 M, sulfato sódico 0.1 M, pH 6.7, a 23 °C. LU, Lubrol PX; TR, Triton X-100; CH, CHAPS; ZW, Zwittergent 3-14; C, mielina control (tratada sólo con tampón); ST, proteínas patrón; HMW, proteínas de alto peso molecular; PLP, proteolípido; BP, proteína básica. Tinción con Coomassie R-250 sobre un gel con gradiente de acrilamida del 5-17%.

acuoso sin detergente (Figura 29, trazo inferior), la conformación media de las cadenas polipeptídicas cambia drásticamente, presentando el máximo de absorción a 1633 cm^{-1} . Ello indica que, en este caso, son las estructuras β las predominantes, y las proteínas se han desnaturalizado. Sin embargo, si en el tampón acuoso en que se suspenden las proteínas delipidadas se incluye el detergente OG, la desnaturalización inducida por este medio se ve amortiguada, en una proporción que depende de la relación OG/proteína. La relación de 8.78 mg de OG/mg de proteína, que es la equivalente a la conseguida cuando se disuelve la membrana mielínica (1 mg proteína/ml) con OG 30 mM, resultó ser la óptima. En la Figura 30 se representan los datos estructurales cuantitativos, obtenidos a partir de los espectros de la Figura 29. A la relación de 8.78 mg OG/mg proteína, se obtuvieron los siguientes resultados: 50% de alfa-hélice, 30% de lámina β y 20% de estructura desordenada, composición prácticamente idéntica a la de la membrana nativa.

Figura 29.- Recuperación de la estructura secundaria nativa de las proteínas de mielina inducida por el octilglucósido. Muestras de mielina se delipidaron con THF, como se describe en Materiales y Métodos, y se suspendieron en tampón fosfato sódico 0.1 M, sulfato sódico 0.1 M, pH 6.7 conteniendo OG en cantidad adecuada para alcanzar las relaciones detergente/proteína (en peso) que se indican a la izquierda de los espectros. Las estructuras en lámina β producen una absorción característica a 1633 cm^{-1} , dentro de la banda de frecuencias amida I, y es máxima para la muestra que no contenía detergente (espectro inferior). Las estructuras en hélice α producen la absorción a 1651 cm^{-1} . El espectro superior corresponde al de la mielina purificada (control), no delipidada.



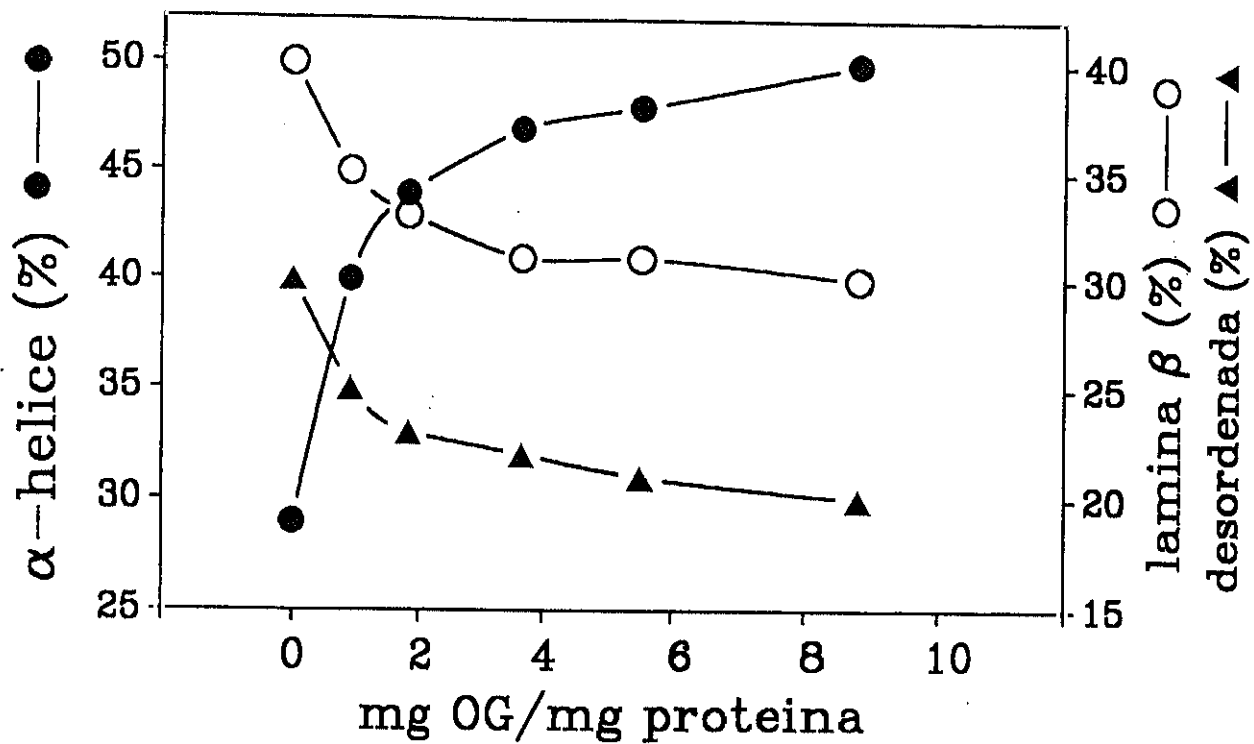


Figura 30.- Resultados cuantitativos de estructura secundaria, obtenidos a partir de los espectros de la Figura 7, como se indica en Materiales y Métodos.

DISCUSION

Los resultados que se presentan muestran que varios detergentes tienen distinto comportamiento, y cada uno tiene ventajas e inconvenientes en la solubilización de la membrana miélnica. A concentraciones comparables, este comportamiento distinto fue evidente en el hecho de que los detergentes no iónicos, Lubrol PX y OG, extrajeron más proteína que los derivados de las sales biliares, colato sódico y CHAPS. Estos últimos extrajeron mucho mejor los fosfolípidos que el colesterol o la proteína. Tales resultados se relacionan claramente con diferencias en el mecanismo de solubilización ejercido por estas dos diferentes clases de moléculas anfifílicas, tan diferentes en sus propiedades químicas y físicas (Helenius y Simons, 1975 (8); Tandford y Reynolds, 1976 (20)), aunque es significativo, en vista de que la membrana miélnica tiene una de las más altas relaciones lípido/proteína de todas las biomembranas conocidas.

Comparando la solubilización de los lípidos de mielina se observó que, con estas dos clases de detergentes, los fosfolípidos se solubilizan mucho mejor que el colesterol, como si la solubilización de aquéllos precediera y promoviera la solubilización de éste. Una observación similar ha sido recientemente publicada para otras biomembranas, como las membranas de plaquetas (Shiao et al., 1989 (21)). De hecho el colesterol puro, a las concentraciones de detergente utilizadas en este estudio, fue escasamente soluble.

Con todos los detergentes se observó que un incremento en la concentración de sales en el medio se traduce en una mayor capacidad de solubilización, necesitándose menores cantidades de detergente para conseguir resultados equivalentes. A 23 °C se observó una enorme mejoría cuando los detergentes se disolvieron en tampón fosfato sódico, pH 6.7, conteniendo sulfato sódico 0.1 M.

Los incrementos moderados de temperatura afectaron positivamente a la solubilidad. Por ejemplo, un aumento desde 4 hasta 23 °C en una solución 50 mM de OG produjo un aumento de solubilidad semejante al obtenido al aumentar

la concentración del detergente desde 50 hasta 150 mM a 4°C (Figura 25). El efecto de la temperatura puede ser importante, y debe ser tenido en cuenta, cuando se trabaja con concentraciones de detergente sólo suficientes para mantener una determinada cantidad de membrana en solución. Una disminución inadvertida de la temperatura puede, en este caso, invertir total o parcialmente la solubilidad inicial, de una manera parecida a lo que sucedería al disminuir la concentración de detergente a temperatura constante.

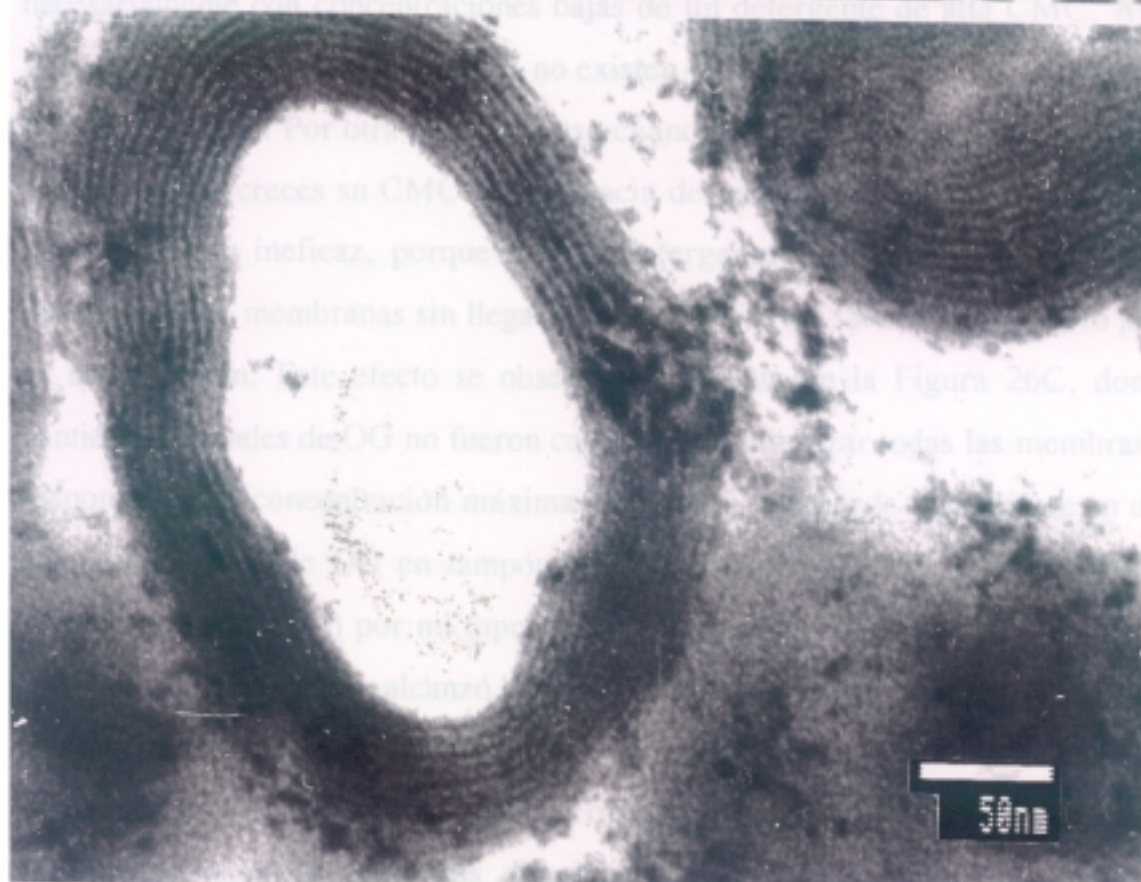
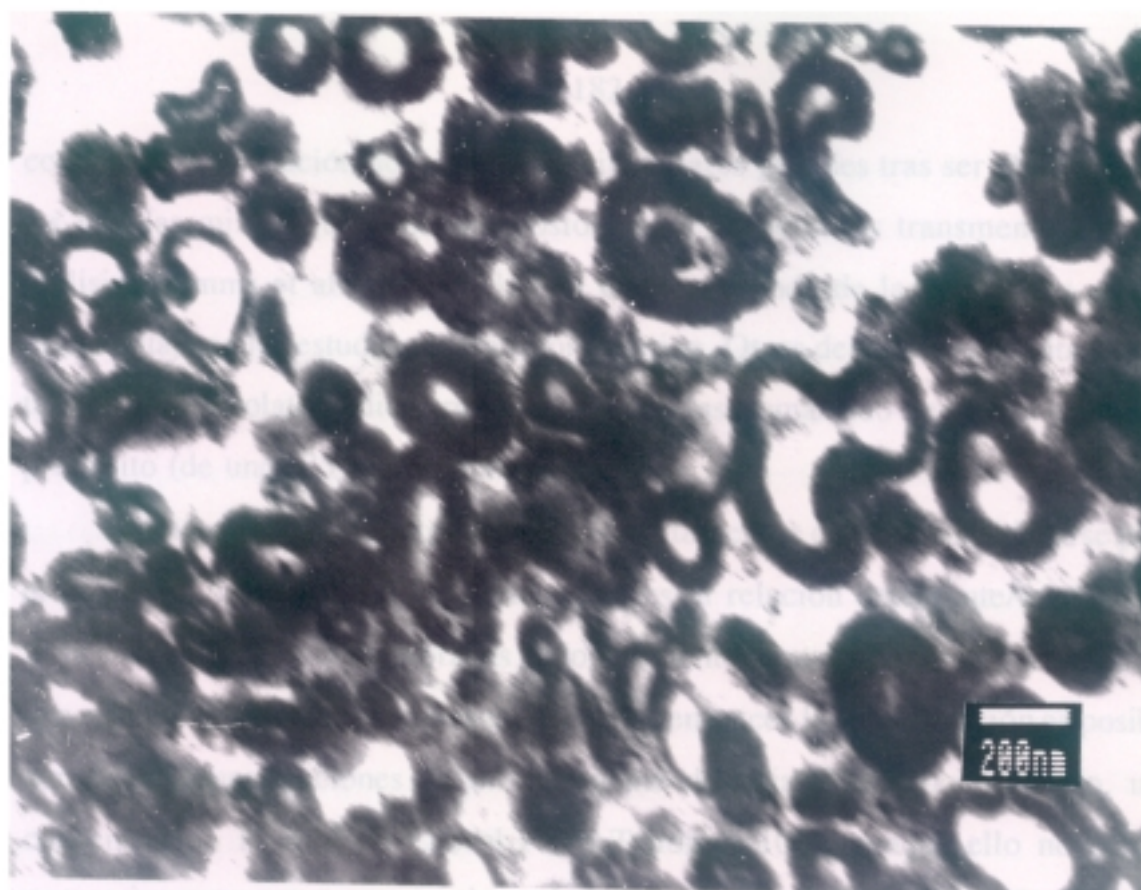
Con respecto al mecanismo de los efectos observados, es de relevancia que la presencia de sales, o el incremento en la temperatura tienden a disminuir la concentración micelar crítica (CMC) de los detergentes (Tandford y Reynolds, 1976 (20)). Sin embargo, como en general se han usado concentraciones bastante superiores a la CMC de los detergentes en el presente estudio (Tabla 6), otras explicaciones adicionales pueden contribuir a explicar el efecto de las sales. Por ejemplo, un efecto *salting-out* podría ser operativo en presencia de ciertas sales, lo cuál podría aumentar la concentración efectiva de los detergentes "secuestrando" moléculas de agua y, por tanto, disminuyendo el agua libre disponible para interactuar con las moléculas de detergente. Otra posibilidad es que algunos aniones, como fosfatos o sulfatos, puedan facilitar la disgregación de las membranas por medio de fuerzas de repulsión con las cabezas polares de fosfolípidos aniónicos y sulfátidos.

La CMC también resulta una importante variable cuando se compara el comportamiento de varios detergentes a una concentración dada. Así, una concentración 30 mM es sólo ligeramente superior a la CMC del OG, pero muy superior a la CMC de otros detergentes, como es el caso de los surfactantes no iónicos listados en la Tabla 6. Este factor es muy importante si se pretende reconstituir las proteínas solubilizadas en vesículas lipídicas. Así, las membranas de mielina solubilizadas con OG 30 mM, a 23 °C y en presencia de sales, a concentración de 1 mg de proteína total/ml (Tabla 7) se insolubilizan

rápida-mente simplemente al diluir la solución. Diluyendo la solución diez veces (OG 3 mM, concentración final) y centrifugando se obtiene un precipitado que es nuevamente soluble en 1 ml de OG 30 mM. En esta segunda solubilización se recuperó una alta proporción de los lípidos y las proteínas originales (aproximadamente el 90%), lo cual indica que los componentes originales se han reasociado formando membranas durante el proceso de dilución. Para verificar esta hipótesis, el precipitado obtenido tras la dilución se examinó al microscopio electrónico (Figura 31). Las micrografías demuestran que el simple procedimiento de dilución induce la formación de vesículas en las que las membranas se han reasociado, con alternancia de bandas densas y bandas claras (Figura 31, abajo) que recuerdan la alternancia línea densa-intraperíodo observada en la vaina de mielina nativa. Es de destacar que estas vesículas formadas por dilución de la solución de mielina en el OG carecen del grupo de proteínas de alto peso molecular incluido en la fracción Wolfgram, puesto que éstas permanecen en el residuo insoluble en este detergente, incluso a concentraciones de surfactante mayores de las utilizadas en este ensayo de reconstitución (Figura 28).

La recuperación de lípidos y proteínas fue muy inferior cuando se utilizó un detergente de baja CMC, como el Lubrol PX (Tabla 6). La razón reside en el hecho de que, incluso tras diluir hasta 3 mM la concentración del detergente, ésta todavía es muy superior a su CMC, y por tanto permanece en el sistema en su estado micelar. La elección de un detergente con alta o baja CMC ha de basarse, por tanto, en los objetivos que se pretendan conseguir con los componentes solubilizados. Si éstos son únicamente la solubilización de la membrana, no es estrictamente útil el utilizar un detergente con alta CMC, debido al riesgo potencial de la reasociación de componentes e insolubilización, motivado por dilución o cambios de temperatura. Sin embargo, los detergentes con alta CMC son decisivamente útiles para protocolos de reconstitución (Racker, 1973 (22)). El OG es particularmente útil para este objetivo, porque

Figura 31.- Vesículas de membrana mielínica obtenidas por dilución de octilglucósido. La mielina purificada se extrajo durante 30 minutos, a 23 °C, con OG 30 mM en tampón fosfato sódico 0.1 M, sulfato sódico 0.1 M, pH 6.7 (1 mg de proteína/ml, concentración final). Se centrifugó a 100.000 g durante 30 minutos, y el sobrenadante se diluyó diez veces con agua. Tras incubarlo a 23 °C durante 15 minutos, el material insolubilizado se sedimentó a 40.000 g durante 15 minutos, se lavó con agua y se procesó para microscopía electrónica, como se describe en Materiales y Métodos.



conduce a la formación de liposomas unilamelares grandes tras ser eliminado de las micelas mixtas que contienen fosfolípidos y proteínas transmembrana por diálisis (Mimms et al., 1981 (23)). El tamaño grande de las vesículas es una gran ventaja en los estudios de transporte iónico. Otros detergentes de alta CMC, tales como el colato sódico, producen vesículas demasiado pequeñas para este propósito (de unos 25 nm de diámetro).

Junto con la CMC, otra variable importante que debe de considerarse para el propósito de solubilizar las membranas es la relación detergente/membrana. Si la concentración de membranas es lo suficientemente baja como para guardar una relación detergente/membrana adecuada, entonces la solubilización es posible con bajas concentraciones de un detergente de baja CMC (por ejemplo, una concentración 10 mM de Lubrol PX o Triton X-100), aunque ello no ocurre necesariamente con concentraciones bajas de un detergente de alta CMC. Así, a una concentración de OG 10 mM no existen micelas de detergente en el medio de solubilización. Por otra parte, incluso cuando la concentración del detergente sobrepasa con creces su CMC, la presencia de una gran exceso de membranas puede volverlo ineficaz, porque todo el detergente disponible en el medio se incorpora a las membranas sin llegar a alcanzar el nivel saturante necesario para su disgregación. Este efecto se observa claramente en la Figura 26C, donde cantidades grandes de OG no fueron capaces de solubilizar todas las membranas disponibles. La concentración máxima de mielina que puede mantenerse en una solución 30 mM de OG en tampón fosfato/sulfato, a 23 °C, es de 3 mg de membrana (peso seco) por ml (aproximadamente 1 mg de proteína/ml).

Incluso cuando se alcanzó la casi total solubilización de 1 mg de proteína total por cada ml de solución 60 mM de detergente en todos los casos, el hecho de que los pequeños residuos insolubles obtenidos tras la centrifugación muestren una composición de proteínas diferente a la de las proteínas disueltas, y dependiente del tipo de detergente empleado (Figura 28), pone de manifiesto

diferencias en el mecanismo de la solubilización de las proteínas. Las bandas de alto peso molecular, observadas en los residuos insolubles en los detergentes no iónicos y CHAPS deben corresponder a las que podrían constuir el componente radial de la mielina de SNC (Pereyra et al., 1988 (2); Kosaras y Kirschner, 1990 (3)), esto es, la CNPasa, MAG, actina, tubulina, etc. Los detergentes no iónicos y el CHAPS, *a priori*, no deberían ser capaces de romper las fuertes interacciones proteína-proteína que tienen lugar entre estas proteínas minoritarias, al contrario de lo que sucede con el SDS o el Zwittergent 3-14.

El OG, en cloruro sódico o en tampón fosfato conteniendo sulfatos, ha sido utilizado en la fase móvil para la separación de otras proteínas de membrana como rodopsina o bacteriorodopsina, utilizando la técnica de HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC) (DeLucas y Muccio, 1984 (17); Muccio y DeLucas, 1985 (18)).

En resumen, los resultados mostrados en esta sección muestran que, de los siete detergentes ensayados, el SDS y el Zwittergent 3-14 son los mejores agentes solubilizantes, si bien no son los más indicados cuando el propósito es el de mantener la estructura nativa de las proteínas en solución (Muccio y DeLucas, 1985 (18)). Cuando éste es el caso, el Lubrol PX y el octilglucósido parecen los más indicados; utilizando un tampón salino adecuado (fosfato sódico 0.1 M conteniendo sulfato sódico 0.1 M) se consigue una alto grado de solubilización (85-90%) con una concentración relativamente baja de detergente (30 mM); en estas condiciones se consigue, además, un primer fraccionamiento claro y sencillo entre las proteínas solubles (proteolípidos y proteína básica), y el residuo insoluble constituido por proteínas de alto peso molecular (Figura 28). Entre los dos, el más indicado parece el octilglucósido, por varias razones: por poseer una alta CMC es muy fácilmente eliminable, por diálisis o simplemente por dilución (Figura 31), lo cuál facilita enormemente los protocolos de reconstitución de las proteínas. Tiene una composición química definida, y no

es susceptible a fenómenos de autooxidación, a diferencia del Lubrol PX. Además, como se muestra en las Figuras 29 y 30, es capaz de reemplazar con éxito a los lípidos en su interacción con las proteínas de mielina, preservando su estructura secundaria, cuando la relación detergente/proteína es adecuada (8.78 mg OG/mg proteína). Experimentos de FT-IR como los mostrados en este capítulo para el OG son impracticables para la mayoría de los otros detergentes, debido que interfieren espectroscópicamente con las frecuencias de absorción de las proteínas (Ayala et al., 1987 (24)).

Con respecto a las sales biliares y derivados (colato sódico y CHAPS), su baja capacidad de solubilización de proteína hace que su utilización como solubilizantes de membrana mielínica sea limitada. Sin embargo, su capacidad de extracción de fosfolípidos, incluso a bajas concentraciones de detergente (Figura 24), puede ser potencialmente útil para delipidar la membrana mielínica en una etapa previa a la solubilización de las proteínas, así como para eliminar las proteínas periféricas (proteína básica) si se utilizan relaciones detergente/membrana adecuadas. Esta potencialidad, explotada con éxito en el caso de otras membranas y detergentes (Helenius y Simons, 1975 (8)), se trata con detalle en la siguiente sección de este capítulo.

SEGUNDA PARTE: *Purificación de los
proteolípidos de mielina con detergentes.
Caracterización por SE-HPLC*

MATERIALES Y METODOS

Materiales

El agua usado en todos los experimentos procedió de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore). La sacarosa y la N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) se adquirió de BDH, y el persulfato amónico, la glicina, la acrilamida, la N,N'-metilenbisacrilamida, el ácido tricloroacético (TCA), el ácido trifluoroacético (TFA), y el Tris fueron de Merck. El tetrahidrofurano (THF, grado HPLC) se obtuvo de Probus. Los detergentes utilizados procedieron de las siguientes compañías: Calbiochem [N-octil- β -D-glucopiranosido (OG) y colato sódico (grado ULTROL), y Sigma {3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), OG, Deoxicolato sódico (DOC)}. El HEPES y el MES se obtuvieron de Sigma. El kit para la tinción de los geles de electroforesis con el reactivo de plata se adquirió a los laboratorios Bio-Rad.

Purificación de membrana mielínica

Se purificó la mielina a partir de sustancia blanca de cerebro bovino, como se detalla en el capítulo II. La preparación final, lavada, se separó en alícuotas de 0.5 ml, se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su uso. En todos los experimentos se utilizaron alícuotas descongeladas en el momento.

Ensayos de delipidación

Las suspensiones de mielina (1.75 mg de proteína/ml) y las soluciones de detergente se prepararon en el tampón indicado en cada caso. Ambas se equilibraron a la temperatura deseada antes de realizar el ensayo. Se distribuyeron alícuotas de 1 ml de suspensión de mielina (1.75 mg de proteína) en tubos de policarbonato de 3 ml para el rotor TLA-100.3 de la ultracentrífuga TLA-100 (Beckman), y luego se añadió a cada tubo 1 ml de la solución de detergente,

al doble de concentración que la concentración final deseada en el ensayo. Se taparon los tubos, se agitaron brevemente con vortex, y se incubaron con agitación constante en un agitador orbital, a la temperatura indicada en cada caso, durante 30 minutos. Luego los tubos se centrifugaron a 100,000 g_{av} (50,000 r.p.m.) durante 30 minutos a la temperatura correspondiente. Sobre cada precipitado se repitió el tratamiento, cuando se indique, añadiendo 2 ml de solución de detergente (a la concentración final del ensayo), resuspendiendo el material mediante sonicación muy suave (10 segundos en un sonicador de baño) y agitación con vortex hasta suspensión homogénea, e incubando durante 30 min, como se describe arriba. En todos los experimentos se utilizó un tubo control en el que se substituyó la solución de detergente por un volumen equivalente de tampón.

Finalizados todos los tratamientos con detergente, los precipitados finales se lavaron dos veces con 2 ml de agua para eliminar restos de detergente y tampón.

Análisis de proteína y lípidos

Los precipitados finales, procedentes de muestras delipidadas y de controles, se disolvieron en 1 ml de solución de SDS al 2.5% conteniendo 1% de Na_2CO_3 , agitando con vortex y sonicando cuando fue preciso en un sonicador de baño (Branson). De esta solución se tomaron alícuotas para medir proteína (Lowry et al., 1951 (11)), fósforo lipídico (Ames and Dubin, 1960 (12)) y colesterol (Siedel et al., 1981 (13)). Los fosfolípidos totales se calcularon multiplicando 25 por el fósforo lipídico total (Autilio y Norton, 1963 (25)). En cada muestra se calculó la relación (en peso) fosfolípido/proteína y colesterol/proteína. El porcentaje de lípido residual (fosfolípido o colesterol) que permanece en las muestras se calculó, por comparación con los controles (tratados sólo con tampón, sin detergente), según la fórmula:

$$\% \text{ lípido residual} = [\text{lípido/proteína}]_m \times 100 / [\text{lípido/proteína}]_c$$

donde $[\text{lípido/proteína}]_m$ representa la relación lípido/proteína en la muestra en cuestión y $[\text{lípido/proteína}]_c$ representa la relación lípido/proteína en el control (mielina no delipidada). Esta última fue de 1.27 ± 0.09 (6) para los fosfolípidos y de 0.80 ± 0.08 (7) para el colesterol. El porcentaje de delipidación se calculó como $100 - \% \text{ lípido residual}$.

Solubilización de la mielina delipidada

Muestras de mielina delipidada por cuatro tratamientos con CHAPS 30 mM en Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, a temperatura ambiente, se extrajeron con concentraciones crecientes de OG en tampón fosfato sódico 0.1M pH 6.7 conteniendo 0.1 M sulfato sódico, o concentraciones crecientes de DOC en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó como arriba; los precipitados se disolvieron en un pequeño volumen de SDS 2.5%-Na₂CO₃ 1%, y se determinó proteína en alícuotas del sobrenadante y de la solución del precipitado. Algunas muestras se procesaron para electroforesis y RP-HPLC, como se describe más adelante.

Cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC)

Los lípidos residuales presentes en las muestras delipidadas se identificaron mediante cromatografía sobre placas HPTLC de 10x20 cm precubiertas con silicagel 60 (sin indicador fluorescente) (Merck). Los precipitados delipidados o los controles se suspendieron en un pequeño volumen de agua, y los lípidos se extrajeron por el método de Folch et al., 1957 (26). La fase inferior se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno, y el residuo se redisolvió en un pequeño volumen de cloroformo/metanol 2:1 v/v. Alícuotas de estas soluciones se sembraron en las placas. Se utilizó el doble desarrollo monodimensional para

lípidos polares y lípidos neutros descrito en el capítulo II (ver Pág. 83).

Electroforesis de las proteínas

Las proteínas solubilizadas en los sobrenadantes de delipidación, o en los sobrenadantes de extracción de la membrana delipidada con OG se precipitaron con TCA al 10% (concentración final) a 4 °C durante al menos una hora, y se sedimentaron usando una minifuga para tubos Eppendorff (Beckman). Los precipitados se disolvieron en un pequeño volumen de SDS 2.5%-Na₂CO₃ 1%, sonicando en las muestras que lo requirieron. La composición proteica de la mielina delipidada por CHAPS y de los controles (mielina no delipidada) se analizó a partir de alícuotas de las soluciones en SDS 2.5%-Na₂CO₃ 1% usadas en las determinaciones analíticas. Antes de la electroforesis, las proteínas se transfirieron al tampón de electroforesis (2.5% SDS en Tris-HCl 0.25 M, pH 6.8) utilizando minicolumnas de Sephadex G-25, como se describió en el capítulo II (ver Pág. 84).

Las muestras se sometieron a electroforesis en las condiciones descritas en la primera parte de este capítulo, utilizando geles isocráticos con 14% de acrilamida y un *stacking* de 3% de acrilamida, y se tiñeron con el reactivo revelador de plata. Algunas muestras se analizaron sobre un gel formado con un gradiente de acrilamida del 4 al 22 %.

Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC)

La composición proteica cualitativa de las muestras se analizó también por RP-HPLC, utilizando mezclas de tetrahidrofurano (THF) y agua como fase móvil, y una columna analítica C3 de 30 nm de tamaño de poro como fase estacionaria, en las condiciones descritas en el capítulo III. Las proteínas precipitadas con TCA como en el apartado anterior, o las muestras de mielina delipidada, se disolvieron directamente en un pequeño volumen de THF/agua 4:1

v/v, 0.1 % TFA. Antes de la inyección, se diluyeron con 0.1 % TFA en agua hasta una concentración final de THF en la muestra del 30 %. Las condiciones de elución fueron: 3 minutos isocrático con 30 % de THF seguido de un gradiente linear desde 30 hasta 100 % de THF en agua, conteniendo 0.1 % TFA, a un flujo de 1 ml/min. La detección fue ultravioleta, a 280 nm.

HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC) de la proteínas solubilizadas

Los proteolípidos extraídos con OG 100 mM en tampón fosfato sódico 0.1M, pH 6.7, conteniendo sulfato sódico 0.1 M, se inyectaron sobre un sistema compuesto por una columna analítica Progel-TSK G2000 SW (30 cm x 7.5 mm) conectada a una precolumna Progel-TSK SW (7.5 cm x 7.5 mm), ambas suministradas por Supelco (EEUU). Como fase móvil se utilizó una solución de OG 30 mM en tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 6.7, conteniendo sulfato sódico 0.1 M, a un flujo de 0.5 ml/min. Rutinariamente, la fase móvil se filtró a través de filtros de 0.45 μ m y se desgaseó simultáneamente utilizando un equipo de filtración de Millipore. La detección fue ultravioleta a 280 nm. Las fracciones recolectadas a partir de la columna se precipitaron con TCA al 10 % como arriba, y los precipitados se procesaron para electroforesis.

El peso molecular aparente de las fracciones purificadas se determinó calibrando el sistema formado por la precolumna y la columna con proteínas de peso molecular conocido: β -galactosidasa de *Escherichia coli* (595000 Da, Worthington), piruvato kinasa de músculo de conejo (237000 Da, Sigma), colagenasa de *Chlostridium hystoliticum* (105000 Da, Worthington), y albúmina de suero bovino (66000 Da), ovoalbúmina (43000), β -lactoglobulina (36800), pepsina (34700), tripsinógeno (24000) y lisozima (14300), obtenidas de Sigma. La fase móvil y las condiciones de elución utilizadas para la calibración con estas proteínas fueron las mismas que las utilizadas con las muestras (OG 30 mM en tampón fosfato sódico 0.1M, sulfato sódico 0.1 M, pH 6.7), aunque la omisión

del detergente en la fase móvil no produjo ninguna variación en los tiempos de retención obtenidos con ninguna de éstas proteínas. La recta de calibración que se obtuvo responde a la ecuación:

$$\log M_r = 6.834 - 0.108 \times t_r$$

$$R = 0.999$$

M_r representa el peso molecular, y t_r el tiempo de retención. Para el cálculo de esta ecuación se escogió el tramo lineal de la curva de calibración (pesos moleculares comprendidos entre 14300 y 105000 Da, ambos inclusive).

RESULTADOS

Delipidación de la mielina con sales biliares y derivados. Efecto de la fuerza iónica del medio.

En la Figura 32 se comparó la capacidad de delipidación de las dos sales biliares, colato sódico y deoxicolato sódico (DOC), y del derivado zwitteriónico del primero, el CHAPS, a dos diferentes concentraciones de tampón Tris-HCl (0.1 M y 20 mM) y pH 7.4. La concentración final de los detergentes fue 30 mM en cada uno de estos dos tampones, y se realizaron un total de cuatro tratamientos con detergente, a temperatura ambiente (25 °C), como se describe en Materiales y Métodos. De los tres detergentes estudiados, el CHAPS resultó ser el más indicado para conseguir una alta recuperación de proteína altamente delipidada. Los tratamientos con colato sódico proporcionan una recuperación de proteína aún mayor, pero a costa de una delipidación baja de fosfolípidos, y muy baja de colesterol. Los tratamientos con DOC, sin embargo, provocan una pérdida bastante alta de proteína y un grado de delipidación intermedio entre los conseguidos por colato y CHAPS.

La fuerza del tampón utilizado en los tratamientos también parecen influir en los grados de delipidación alcanzados y en la proteína recuperada. El efecto del aumento de concentración desde 20 mM hasta 0.1 M Tris-HCl se manifiesta en un mayor grado de delipidación de fosfolípidos y colesterol alcanzado con los tres detergentes estudiados. Respecto a la recuperación de proteína, es ligeramente menor para colato y CHAPS, pero mayor en el caso del DOC.

Los resultados que se muestran en la Figura 32 revelan que el CHAPS parece el detergente más indicado para los propósitos que se persiguen en este capítulo, por lo que se estudió con mayor detalle.

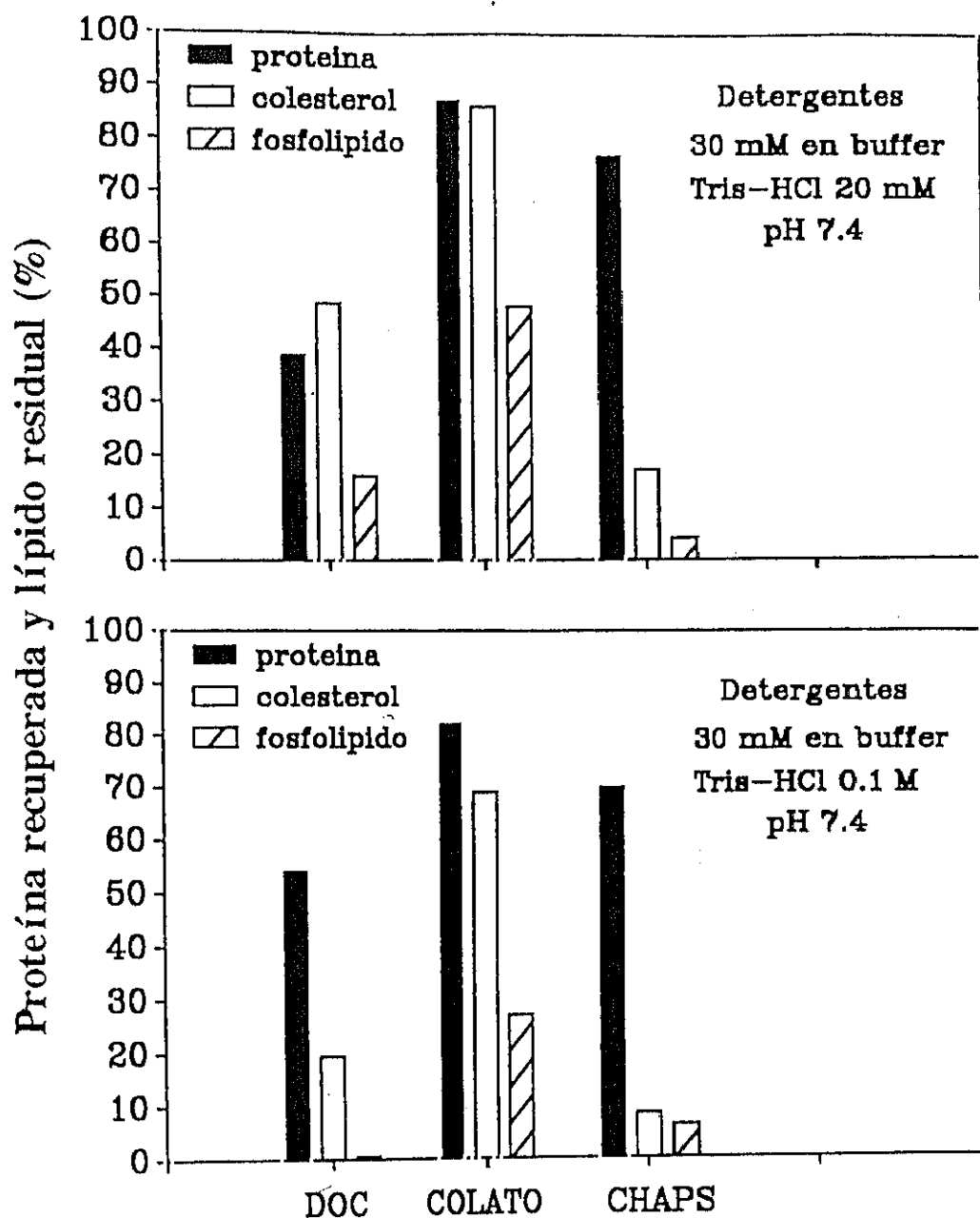


Figura 32.- Comparación de tres detergentes relacionados con las sales biliares en la delipidación de la membrana mielínica. La membrana (1.75 mg de proteína) se trató cuatro veces con 2 ml de solución 30 mM de detergente, disuelto en el tampón indicado en cada caso, a temperatura ambiente (25 °C). En el residuo insoluble final se analizó el contenido en proteína, fósforo lipídico y colesterol. Los resultados se expresan en relación a controles de mielina no tratada con detergentes, como se indica en Materiales y Métodos.

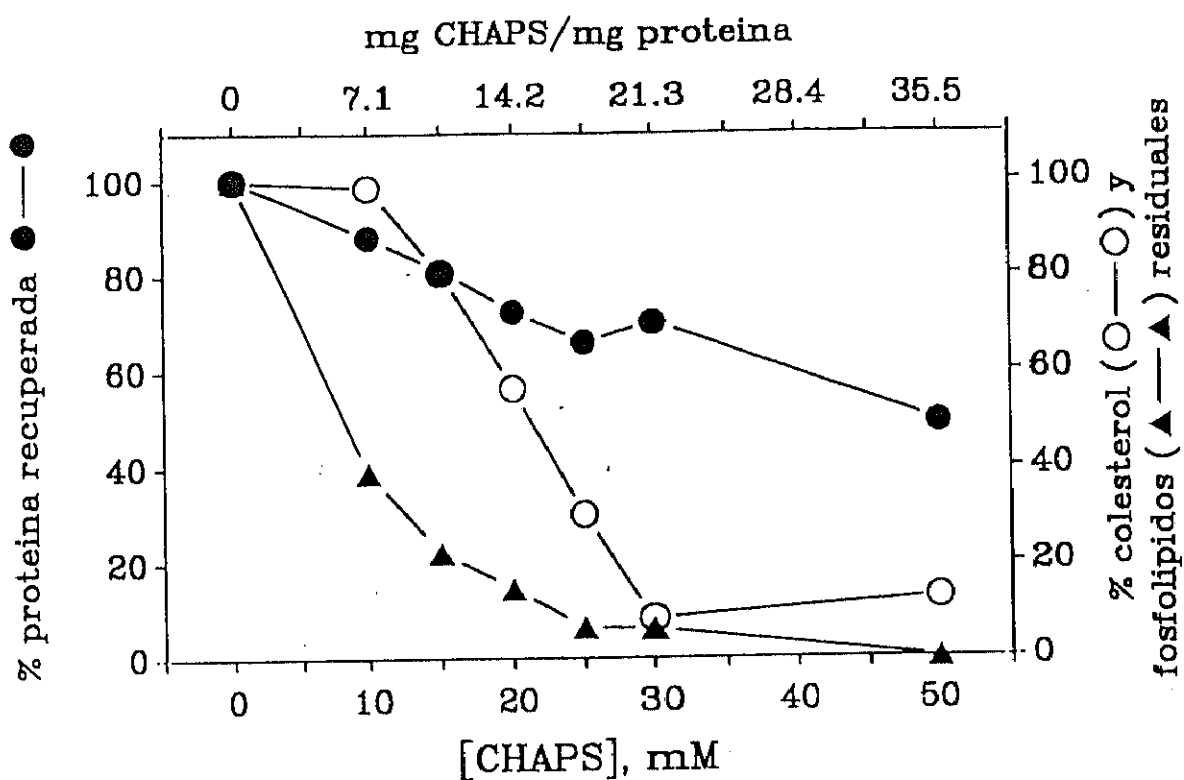


Figura 33.- Efecto de la concentración del CHAPS en la delipidación de la mielina y en la recuperación de proteína. La membrana (1.75 mg de proteína) se trató cuatro veces con dos ml de solución de CHAPS, a las concentraciones indicadas, en tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente (25 °C)

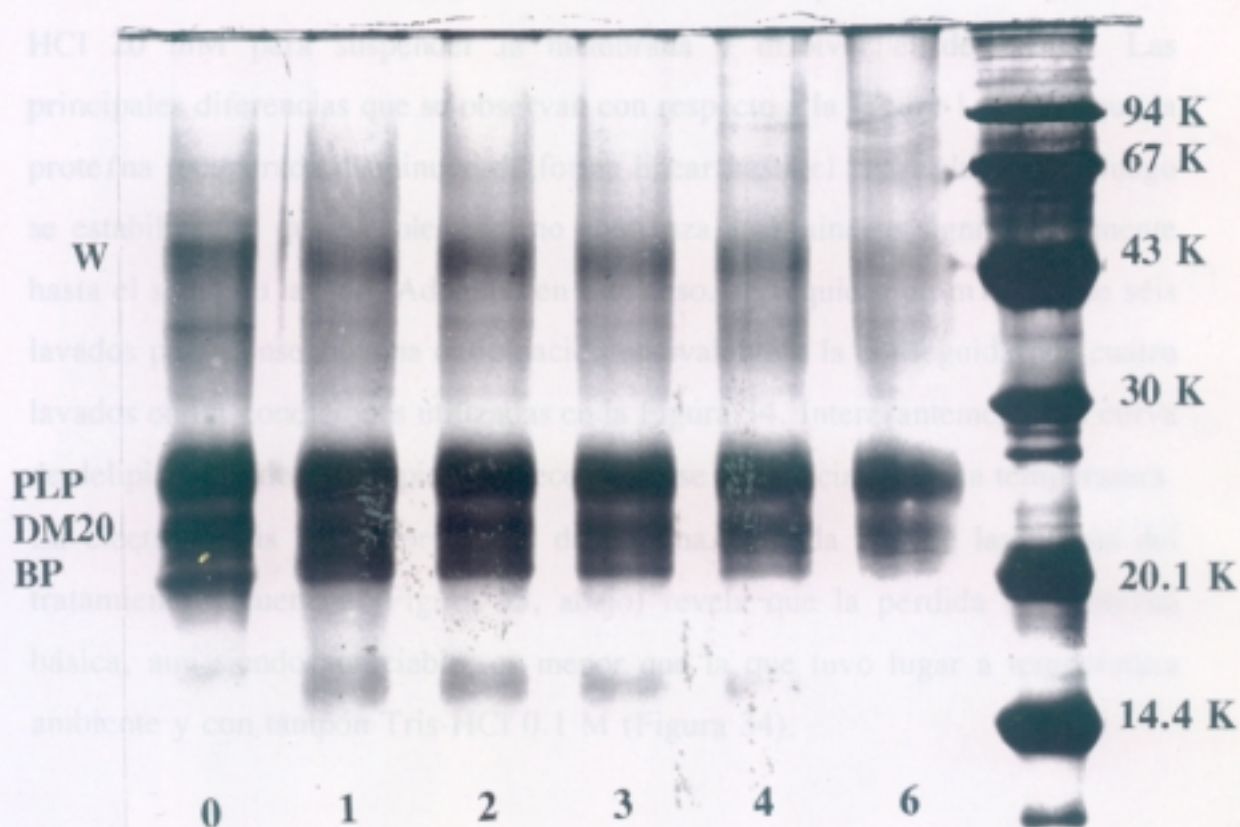
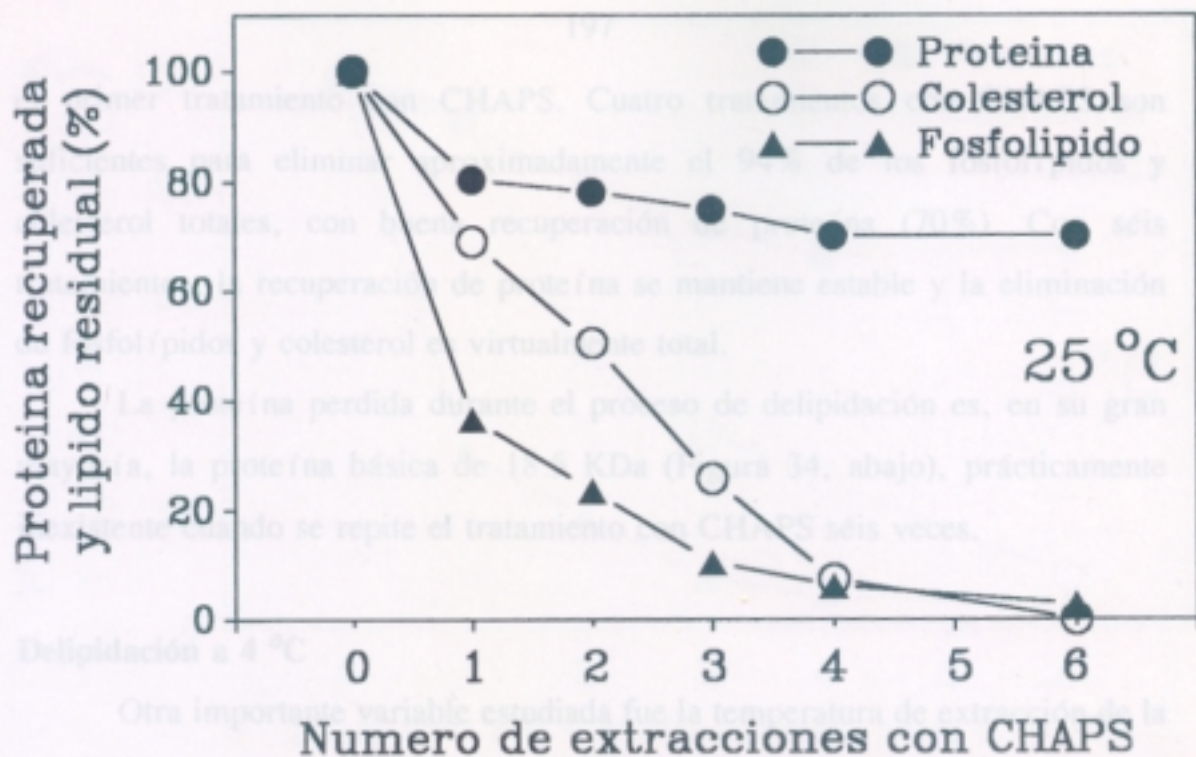
Efecto de la concentración de CHAPS

En la Figura 33 se intenta optimizar la concentración de CHAPS para la delipidación de la membrana. El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente (25 °C) y disolviendo el detergente en tampón Tris-HCl 0.1 M, fijando el número de lavados a cuatro en todos los tubos, con concentraciones crecientes de CHAPS, desde 0 (control) hasta 50 mM. La gráfica indica: a) que la proteína recuperada disminuye aproximadamente de forma linear con la concentración de CHAPS; b) que el colesterol parece extraerse sólo si se supera una concentración umbral de CHAPS (10 mM), a partir de la cuál decae de manera linear al aumentar la concentración del detergente; c) que los fosfolípidos decaen exponencialmente con respecto a la concentración de CHAPS; d) para conseguir una buena delipidación de los dos componentes lipídicos analizados (fosfolípidos y colesterol), con una buena recuperación de proteína, la concentración óptima de CHAPS parece ser 30 mM.

Delipidación de la mielina con CHAPS a temperatura ambiente

Fijada la concentración óptima de CHAPS en 30 mM, se realizó una extracción secuencial de la membrana a temperatura ambiente (25 °C), con el detergente disuelto en tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4. La gráfica que se muestra en la Figura 34 recoge los resultados analíticos llevados a cabo sobre los precipitados, en cada paso de la extracción secuencial. En estas condiciones, se pueden hacer las siguientes generalizaciones: a) se consigue una muy alta delipidación de fosfolípidos y colesterol a partir del tercer tratamiento con CHAPS, con una aceptable recuperación de proteína (70%); b) la pérdida de proteína tiene lugar, en su mayor parte, durante el primer tratamiento con CHAPS, y luego se estabiliza; c) El colesterol decae linealmente respecto al número de lavados con CHAPS, hasta el cuarto lavado; d) Los fosfolípidos, sin embargo, decaen exponencialmente, siendo muy apreciable la delipidación desde

Figura 34.- Extracción secuencial de la mielina con CHAPS 30 mM en tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, a temperatura ambiente (25 °C). La muestra de membrana (1.75 mg de proteína) se extrajo el número de veces que se indica en cada caso con 2 ml de solución de detergente. En los residuos insolubles se analizó el contenido en proteína, fósforo y colesterol (gráfica de arriba), y se examinó su composición proteica por SDS-PAGE (abajo), sobre un gel con 14% de acrilamida teñido con el reactivo de plata. Los números que aparecen debajo de cada calle del gel representan el número de extracciones con la solución del detergente. W, proteínas de la fracción Wolfgram; BP, proteína básica.



Efecto del pH del medio

La influencia del pH sobre la recuperación de proteína y la delipidación

el primer tratamiento con CHAPS. Cuatro tratamientos con CHAPS son suficientes para eliminar aproximadamente el 94% de los fosfolípidos y colesterol totales, con buena recuperación de proteína (70%). Con seis tratamientos, la recuperación de proteína se mantiene estable y la eliminación de fosfolípidos y colesterol es virtualmente total.

La proteína perdida durante el proceso de delipidación es, en su gran mayoría, la proteína básica de 18.5 KDa (Figura 34, abajo), prácticamente inexistente cuando se repite el tratamiento con CHAPS seis veces.

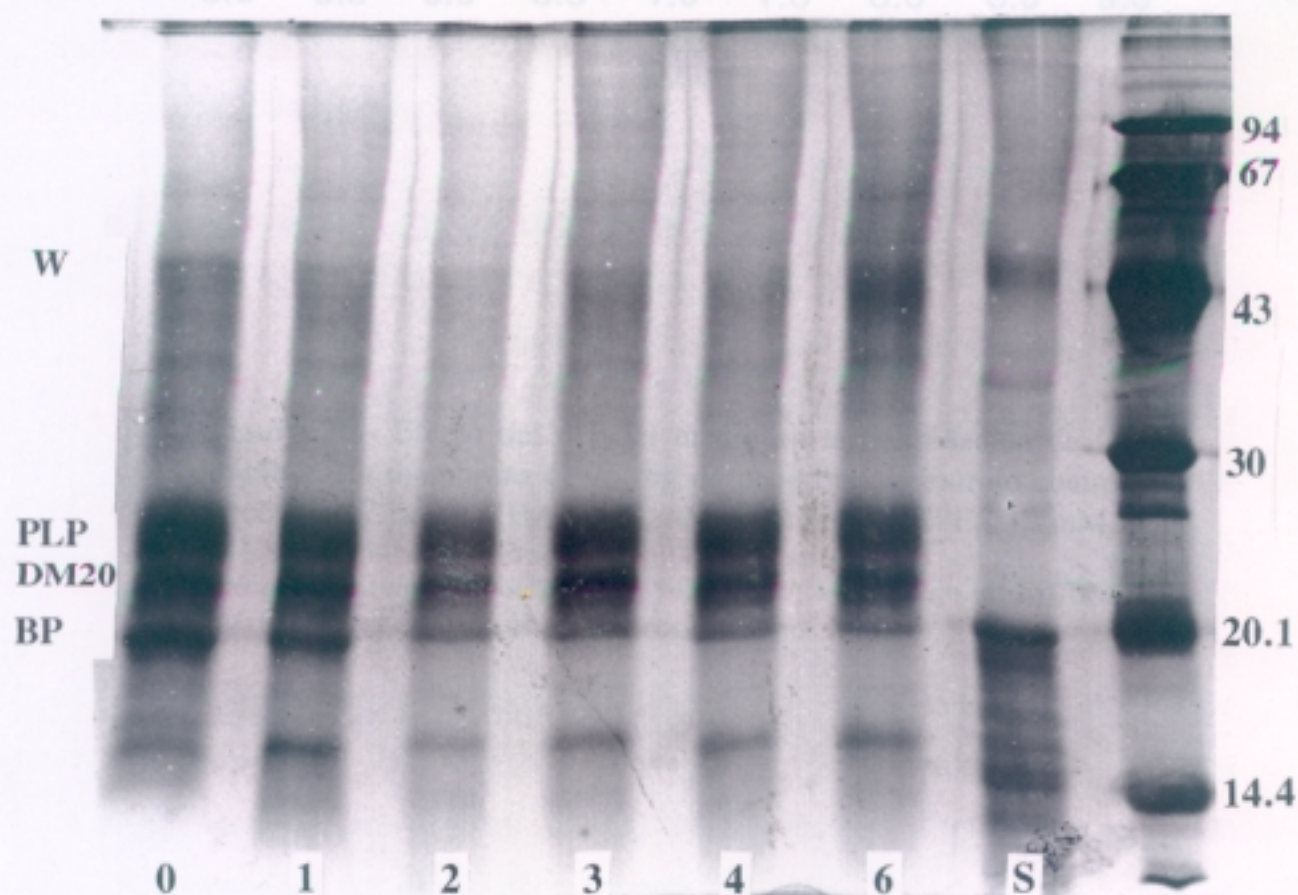
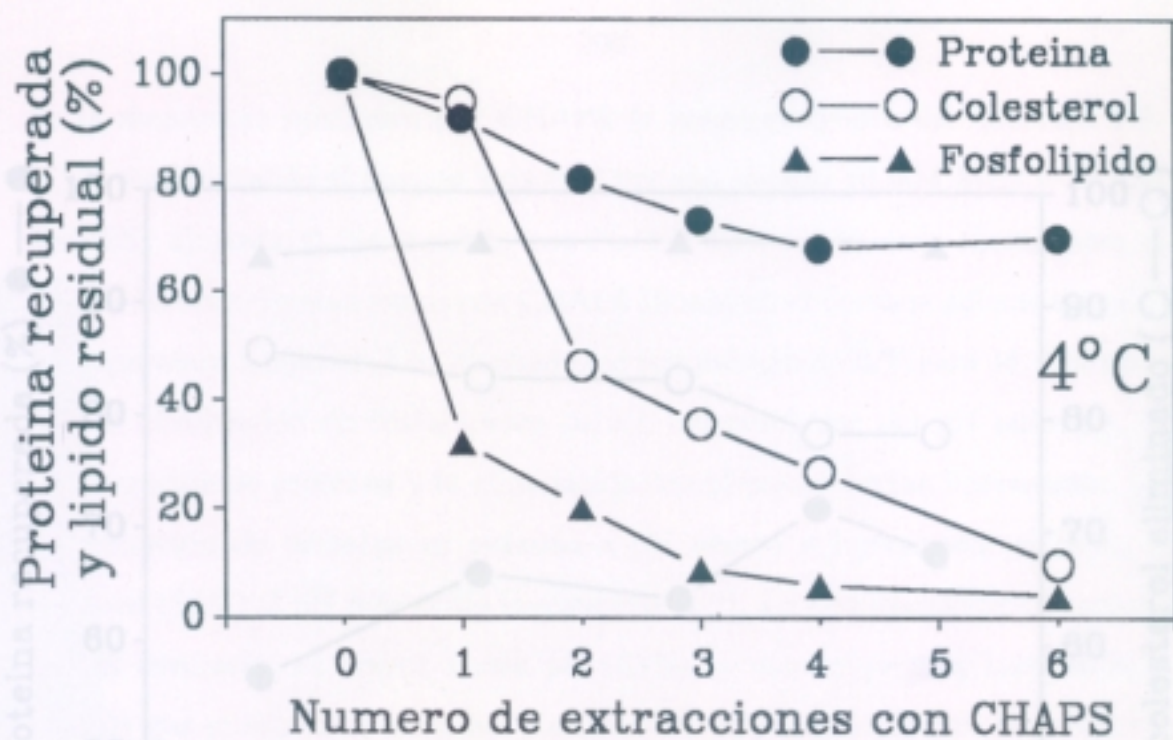
Delipidación a 4 °C

Otra importante variable estudiada fue la temperatura de extracción de la mielina con el detergente. La Figura 35 es equivalente a la Figura 34, pero llevando a cabo los tratamientos con CHAPS a 0-4 °C, y utilizando tampón Tris-HCl 20 mM para suspender la membrana y disolver el detergente. Las principales diferencias que se observan con respecto a la Figura 1 son: a) que la proteína recuperada disminuye de forma lineal hasta el cuarto lavado, y luego se estabiliza; b) que el colesterol no comienza a eliminarse significativamente hasta el segundo lavado. Además, en este caso, se requiere un mínimo de seis lavados para conseguir una delipidación equivalente a la conseguida por cuatro lavados en las condiciones utilizadas en la Figura 34. Interesantemente, la curva de delipidación de fosfolípidos parece no verse influenciada por la temperatura. La electroforesis de las proteínas de mielina en cada una de las etapas del tratamiento secuencial (Figura 35, abajo) revela que la pérdida de proteína básica, aun siendo apreciable, es menor que la que tuvo lugar a temperatura ambiente y con tampón Tris-HCl 0.1 M (Figura 34).

Efecto del pH del medio

La influencia del pH sobre la recuperación de proteína y la delipidación

Figura 35.- Extracción secuencial de la mielina con CHAPS 30 mM en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, a 0-4 °C. Las muestras se procesaron como se ha explicado en la leyenda de la Figura 34. En el gel que se muestra en la parte inferior, la calle S corresponde a la proteína extraída en el sobrenadante del primer tratamiento con CHAPS.



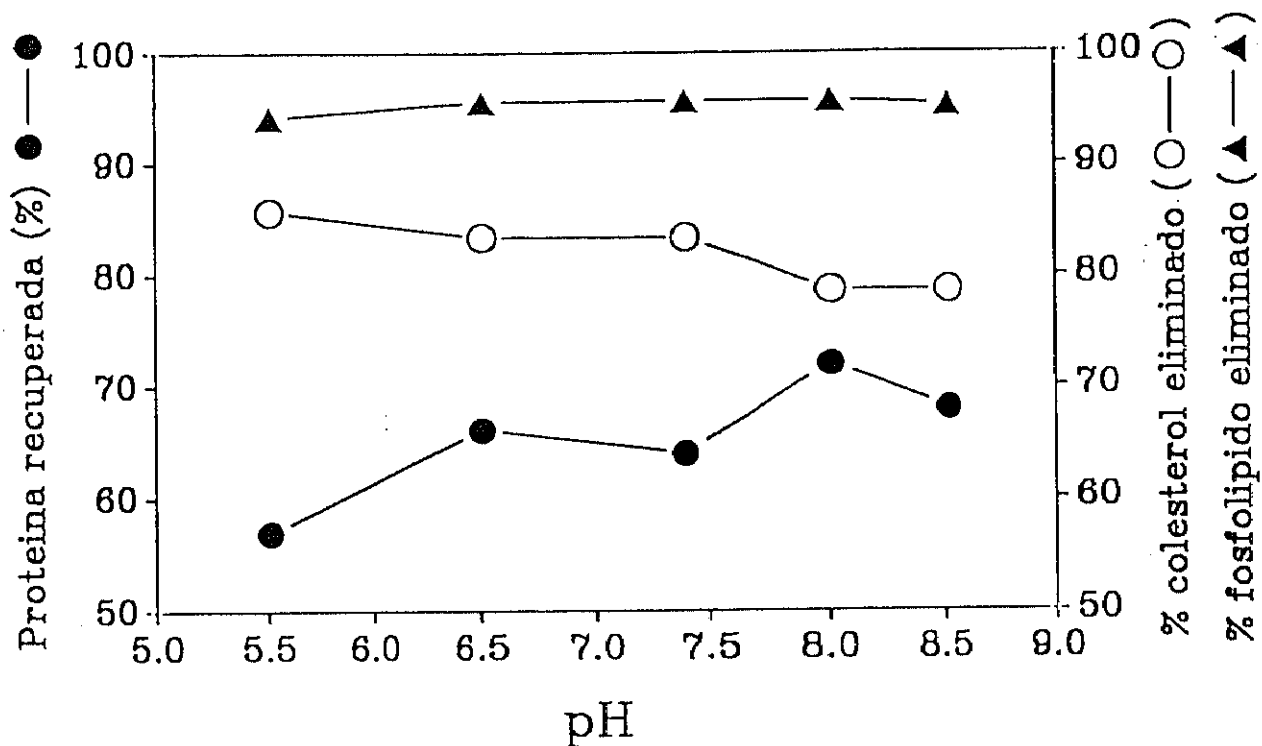


Figura 36.- Efecto del pH del medio en la delipidación de la mielina. La membrana (1.75 mg de proteína) se extrajo cuatro veces con 2 ml de CHAPS 30 mM en tampón HEPES 10 mM, MES 10 mM, ajustado al pH indicado con NaOH, y a temperatura ambiente (25 °C). Se analizó la proteína, el fósforo lipídico y el colesterol en los residuos insolubles.

de la membrana mielínica por CHAPS se investigó dentro del intervalo 5.5-8.52, reemplazando el tampón Tris-HCl por una mezcla 10 mM MES y 10 mM HEPES, ajustada al pH deseado con NaOH. Las condiciones fijadas para el ensayo fueron: 4 tratamientos con CHAPS 30 mM en el correspondiente tampón, a temperatura ambiente. Los resultados se representan en la Figura 36. Mientras que la eliminación de fosfolípidos parece independiente del pH utilizado, la recuperación de proteína y la eliminación de colesterol varían ligeramente. La recuperación de proteína es máxima a pH neutro o ligeramente alcalino, y mínima (55%) al pH más ácido investigado (5.5). La eliminación de colesterol, por el contrario, es mayor a este pH (85%), y disminuye muy lentamente a medida que se alcaliniza el medio. Resumiendo, se puede decir que, en el margen de pHs estudiado, no existen grandes variaciones en cuanto al grado de delipidación alcanzado, pero la recuperación de proteína es mayor a pHs neutros o ligeramente alcalinos.

Análisis cualitativo de los lípidos residuales

La mielina delipidada por seis tratamientos con CHAPS en las condiciones descritas en la Figura 35 se sometió a una extracción de Folch et al., 1957 (26), y el material extraído se sembró en una placa de HPTLC. La Figura 37 muestra la composición de los lípidos residuales, en comparación con los de la mielina no delipidada. El único fosfolípido detectable, incluso a altas concentraciones de muestra, fue la esfingomielina. Se detectaron también restos de colesterol. Sin embargo, los lípidos residuales más abundantes fueron los glicolípidos, especialmente los cerebrósidos en sus dos formas (con ácido graso hidroxilado o no hidroxilado). Los sulfátidos son también detectables, aunque en mucha menor proporción. Aparece además una banda no identificada, migrando inmediatamente por debajo del colesterol.

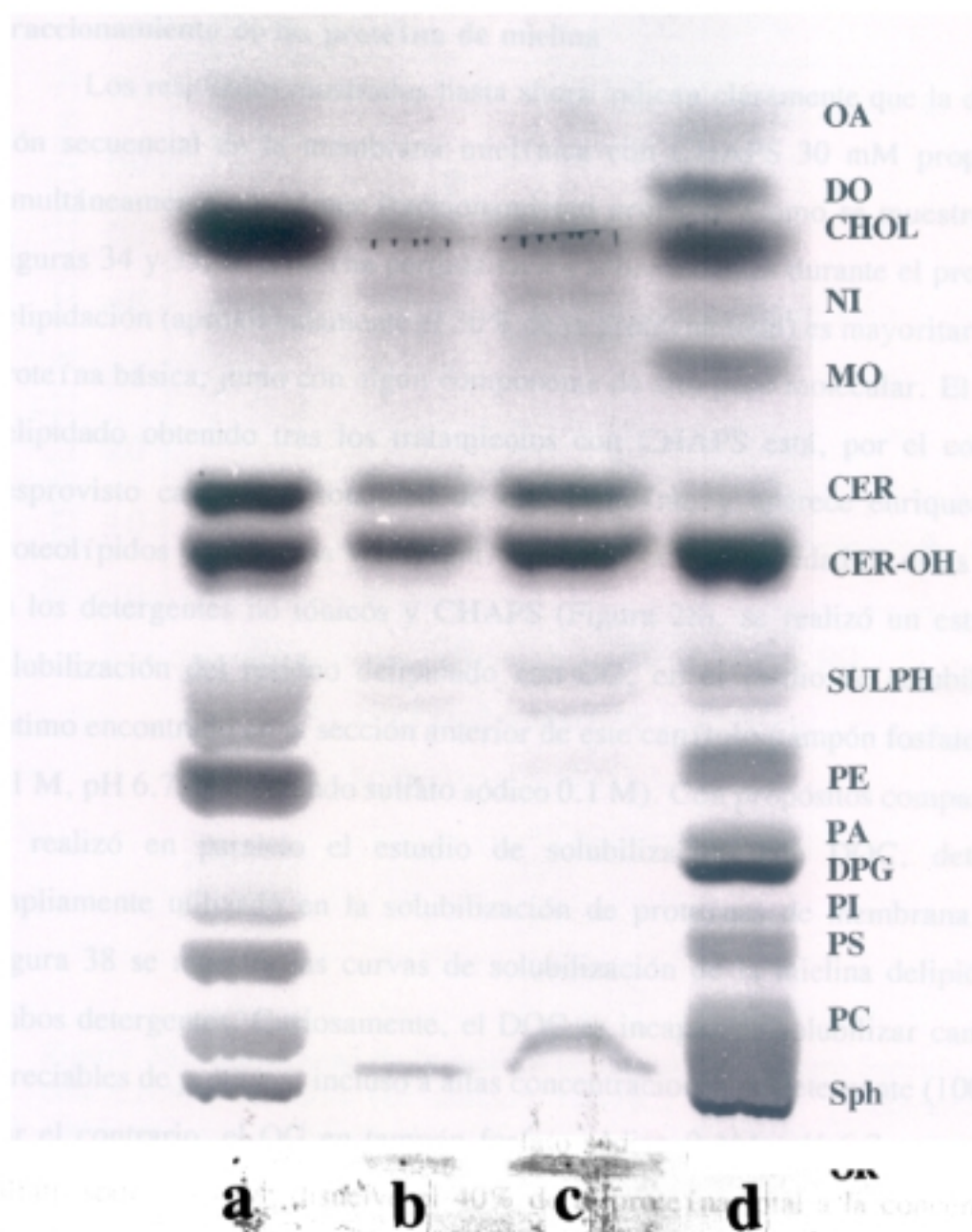


Figura 37.- Caracterización de los lípidos residuales presentes en la mielina delipidada. Los lípidos de la membrana purificada (control), o la membrana delipidada seis veces con CHAPS 30 mM, a 0-4 °C y en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, se extrajeron por el método de Folch et al. y se analizaron sobre una placa de HPTLC, como se describe en Materiales y Métodos. (a), lípidos asociados a 100 µg de proteína de la mielina control; (b), lípidos asociados a 100 µg de proteína de la mielina delipidada; (c), lípidos asociados a 200 µg de proteína de la mielina delipidada; (d), mezcla de lípidos patrones. Revelado con reactivo de acetato de cobre. OA, ácido oleico; DO, dioleína; CHOL, colesterol; NI, no identificado; MO, monooleína; CER, cerebrósido; CER-OH, cerebrósido con ácido graso hidroxilado; SULPH, sulfátidos; DPG, cardiolipina; Sph, esfingomielina; PA, ácido fosfatídico; PE, PI, PS, PC, fosfoglicéridos de etanolamina, inositol, serina y colina, respectivamente. OR, origen.

Fraccionamiento de las proteína de mielina

Los resultados mostrados hasta ahora indican claramente que la delipidación secuencial de la membrana mielínica con CHAPS 30 mM proporciona simultáneamente un primer fraccionamiento proteico. Como se muestra en las Figuras 34 y 35, la proteína perdida en los sobrenadantes durante el proceso de delipidación (aproximadamente el 30% de la proteína total) es mayoritariamente proteína básica, junto con algún componente de alto peso molecular. El residuo delipidado obtenido tras los tratamientos con CHAPS está, por el contrario, desprovisto casi en su totalidad de esta proteína, y aparece enriquecido en proteolípidos y proteínas Wolfgram. Conocida la insolubilidad de éstas últimas en los detergentes no iónicos y CHAPS (Figura 28), se realizó un estudio de solubilización del residuo delipidado con OG, en el medio de solubilización óptimo encontrado en la sección anterior de este capítulo (tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 6.7, conteniendo sulfato sódico 0.1 M). Con propósitos comparativos, se realizó en paralelo el estudio de solubilización con DOC, detergente ampliamente utilizado en la solubilización de proteínas de membrana. En la Figura 38 se muestra las curvas de solubilización de la mielina delipidada en ambos detergentes. Curiosamente, el DOC es incapaz de solubilizar cantidades apreciables de proteína, incluso a altas concentraciones de detergente (100 mM). Por el contrario, el OG en tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 6.7, conteniendo sulfato sódico 0.1 M, disuelve el 40% de la proteína total a la concentración más baja ensayada (30 mM), y el 70% a 100 mM. La naturaleza de estas proteínas extraídas por el OG se analizó por RP-HPLC, y se recoge en la Figura 39. A todas las concentraciones de OG probadas, las proteínas extraídas fueron principalmente, y casi exclusivamente proteolípidos. El residuo no solubilizado por OG 100 mM, como se mostrará más adelante, aparece muy enriquecido en proteínas de alto peso molecular (fracción Wolfgram). Ello significa que, combinando la delipidación secuencial de CHAPS con la extracción de la mielina

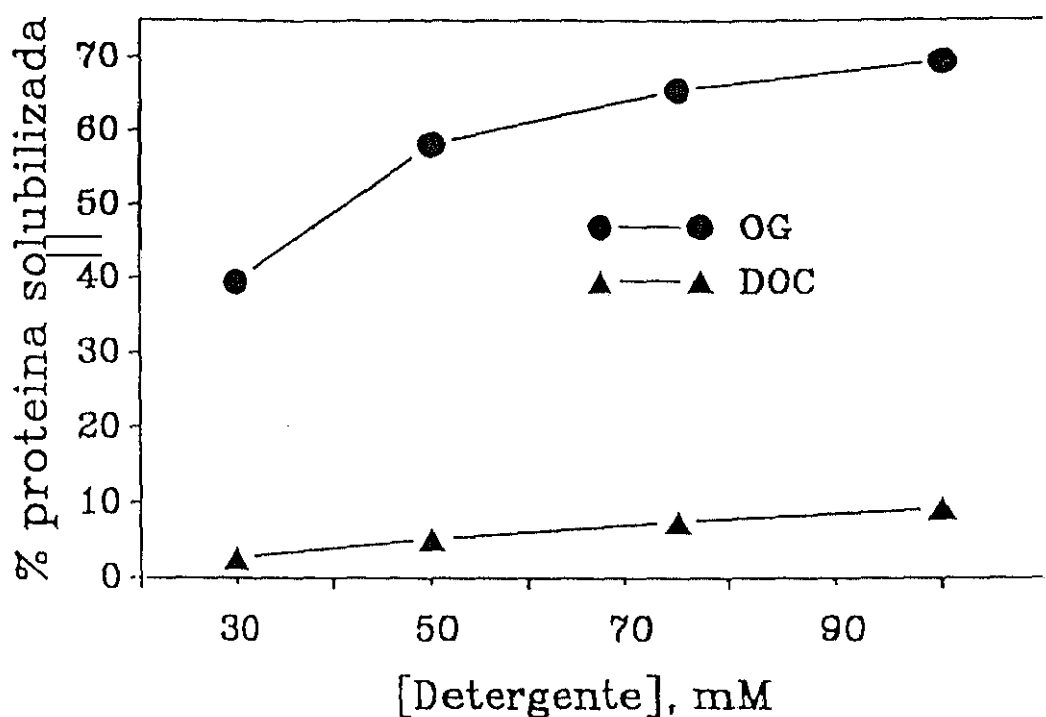


Figura 38.- Solubilidad de la mielina delipidada por cuatro tratamientos con CHAPS 30 mM (en tampón Tris-HCl 20 mM y temperatura ambiente) en octilglucósido (OG) y en deoxicolato sódico (DOC). Volúmenes de 1 ml de solución de cada detergente, a la concentración indicada, se añadieron sobre 1.29 mg de proteína delipidada. Tras incubar y centrifugar como se describe en Materiales y Métodos, se analizó proteína en los sobrenadantes y en los precipitados. Las soluciones de OG se prepararon en tampón fosfato sódico 0.1 M, sulfato sódico 0.1 M, pH 6.8. Las soluciones de deoxicolato se prepararon en Tris-HCl 20 mM, pH 7.4.

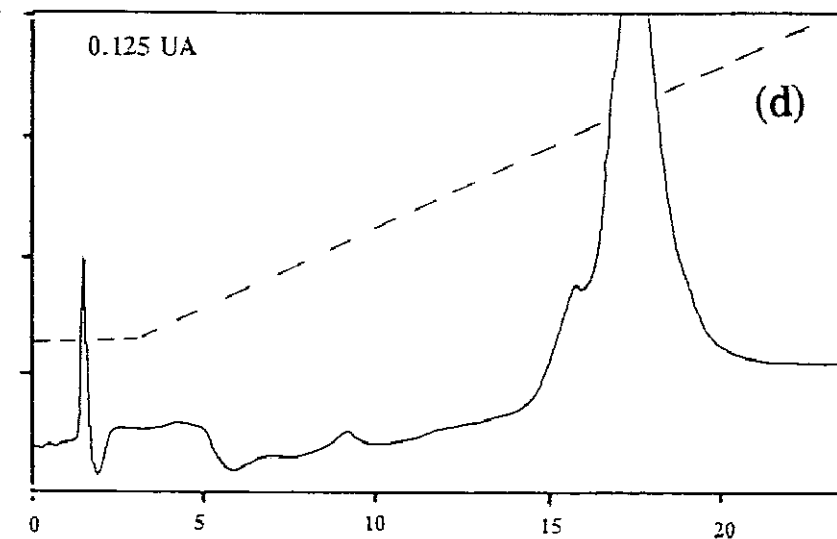
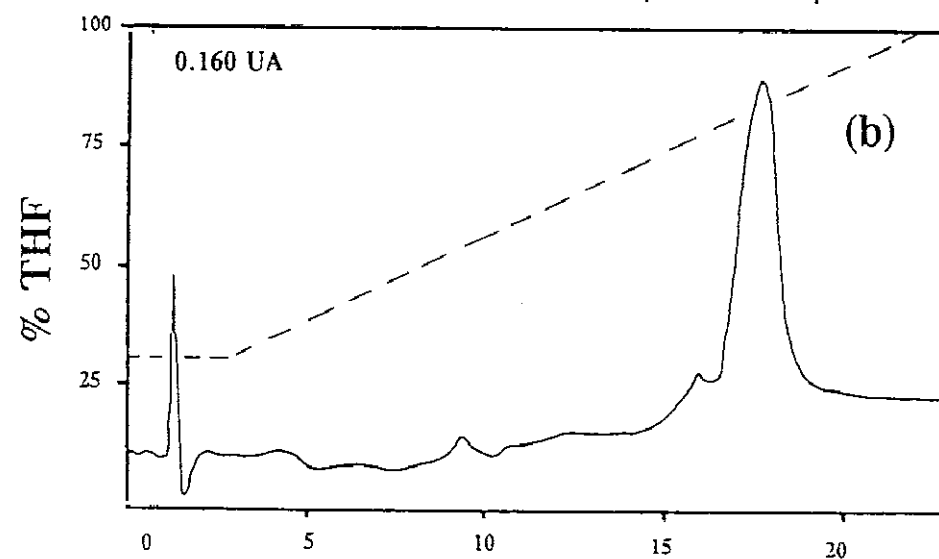
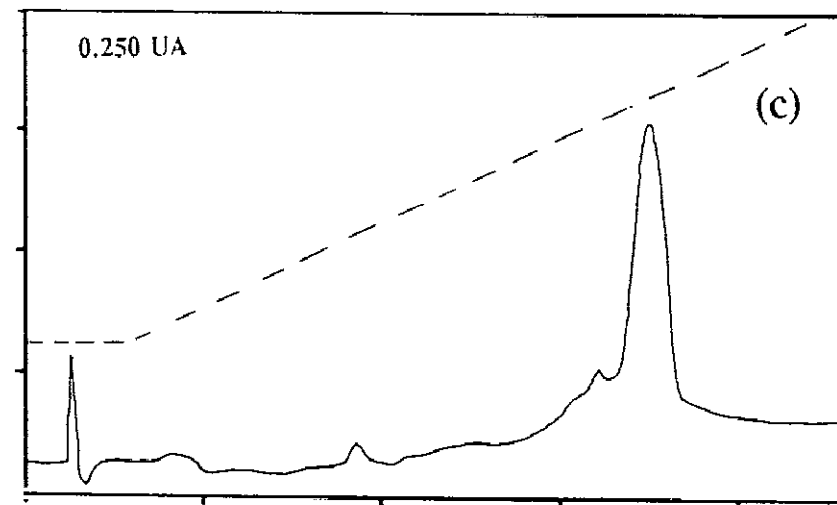
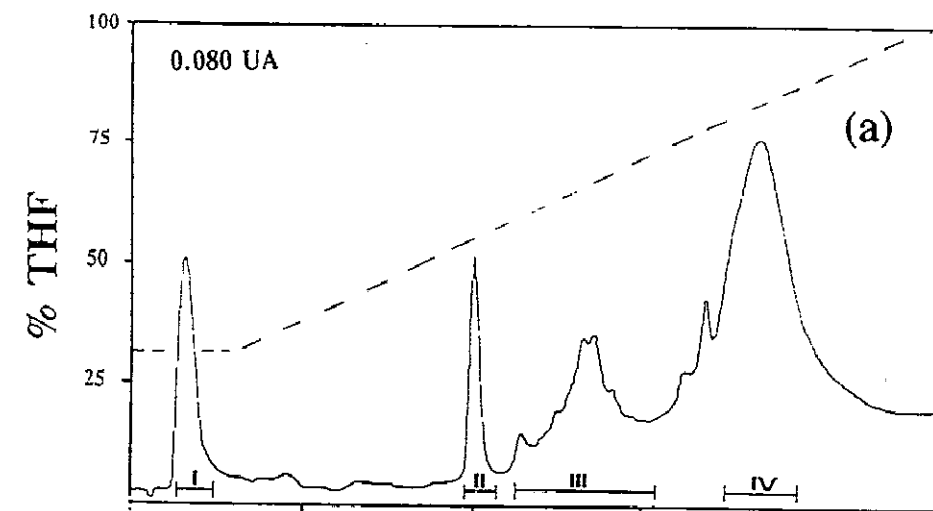
delipidada con OG, es posible separar de manera rápida y sencilla las tres fracciones proteicas principales de la membrana mielínica: proteína básica, proteolípidos y fracción Wolfgram.

SE-HPLC de los proteolípidos extraídos con OG

La proteína extraída por el OG 100 mM en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.8, conteniendo sulfato sódico 0.1 M, se sometió a un fraccionamiento por SE-HPLC. El objetivo de estos experimentos fue el de determinar el peso molecular de los complejos detergente-proteolípido, y el estado de agregación de la proteína extraída en condiciones, *a priori*, no desnaturalizantes. Un cromatograma típico se representa en el panel superior de la Figura 40. La proteína eluida se desdobla en 4 fracciones denominadas a, b, c y d en orden decreciente de peso molecular. Cada una de ellas, recromatografiadas por separado en las mismas condiciones produce un único pico que eluye a un tiempo de retención idéntico al que tiene en el cromatograma original (Figura 40). Los resultados fueron altamente reproducibles, y los tiempos de retención de las fracciones y la forma de los cromatogramas no variaron independientemente de la proteína inyectada, dentro del rango de 120-320 μ g. La temperatura a la que se somete la muestra, sin embargo, sí parece influir en la proporción relativa de cada uno de los componentes, como se muestra en la Figura 42. La proteína recientemente extraída con OG 100 mM a temperatura ambiente produce el cromatograma representado en el panel superior. Cuando esta misma muestra se enfría toda la noche a 4 °C, y se equilibra a temperatura ambiente antes de inyectar, puede observarse que el componente de alto peso molecular (fracción a) ha aumentado en detrimento del componente mayoritario, la fracción C (panel central). El efecto es aún más marcado si se repite el ciclo de enfriamiento con la misma muestra (panel inferior).

A partir de la recta de calibración del sistema formado por la columna y

Figura 39.- Naturaleza de las proteínas de la mielina delipidada con CHAPS que son solubles en OG, analizadas por RP-HPLC. Los sobrenadantes obtenidos tras la extracción de la mielina delipidada por CHAPS con diferentes concentraciones de OG, en las condiciones descritas para la Figura 38, se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% durante una hora a 4 °C. Los precipitados se sedimentaron por centrifugación, y se inyectaron en una columna C3 analítica, como se describe en Materiales y Métodos. (a) Cromatograma típico de las proteínas totales de mielina; I, frente del solvente (sin proteína detectable); II, proteína(s) básica(s); III, proteínas de la fracción Wolfgram; IV, proteolípidos. (b), (c) y (d), proteína extraída por el OG 100 mM, 75 mM y 50 mM, respectivamente. A todas las concentraciones de OG ensayadas, las proteínas disueltas son, casi exclusivamente, de naturaleza proteolípida.



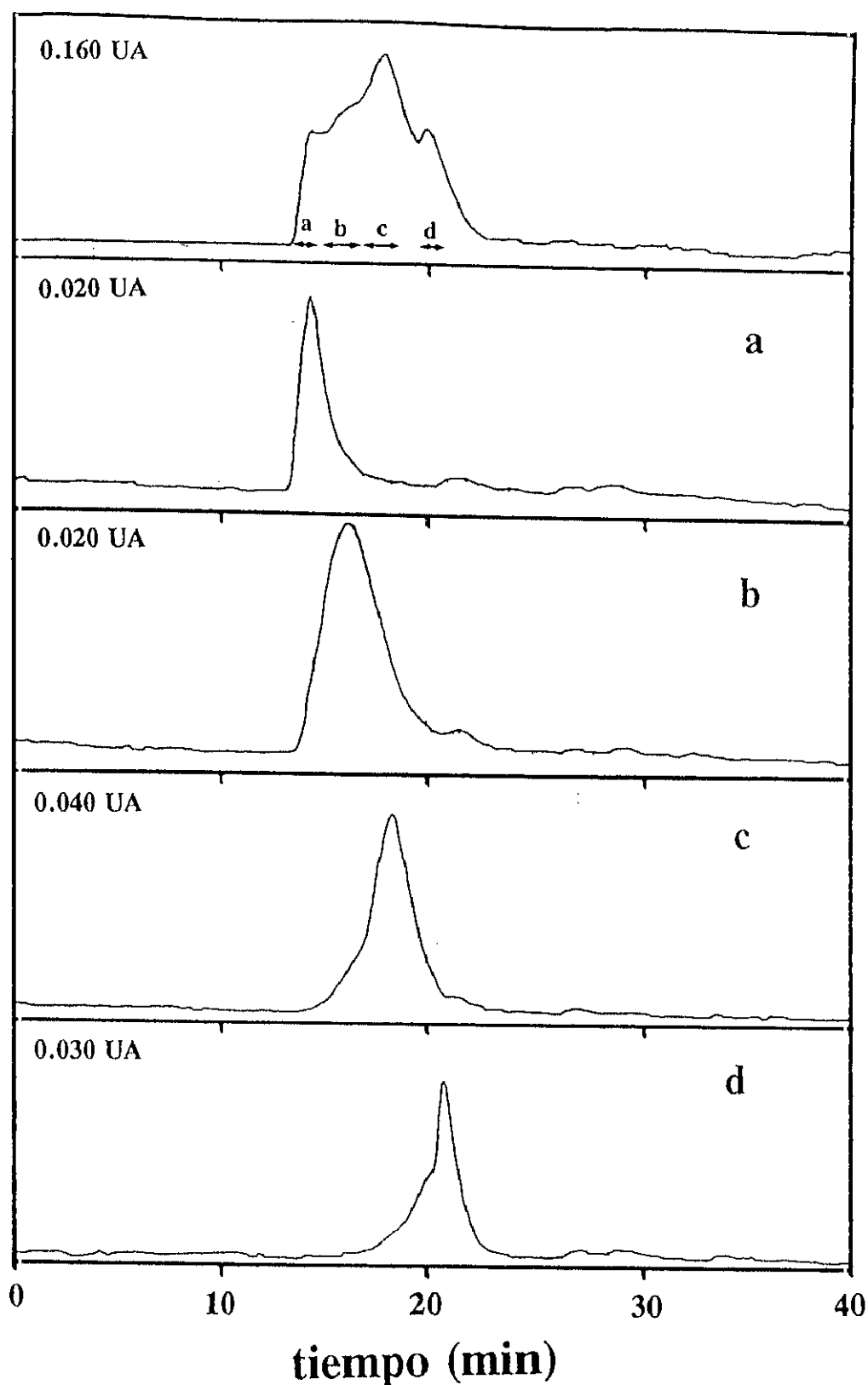
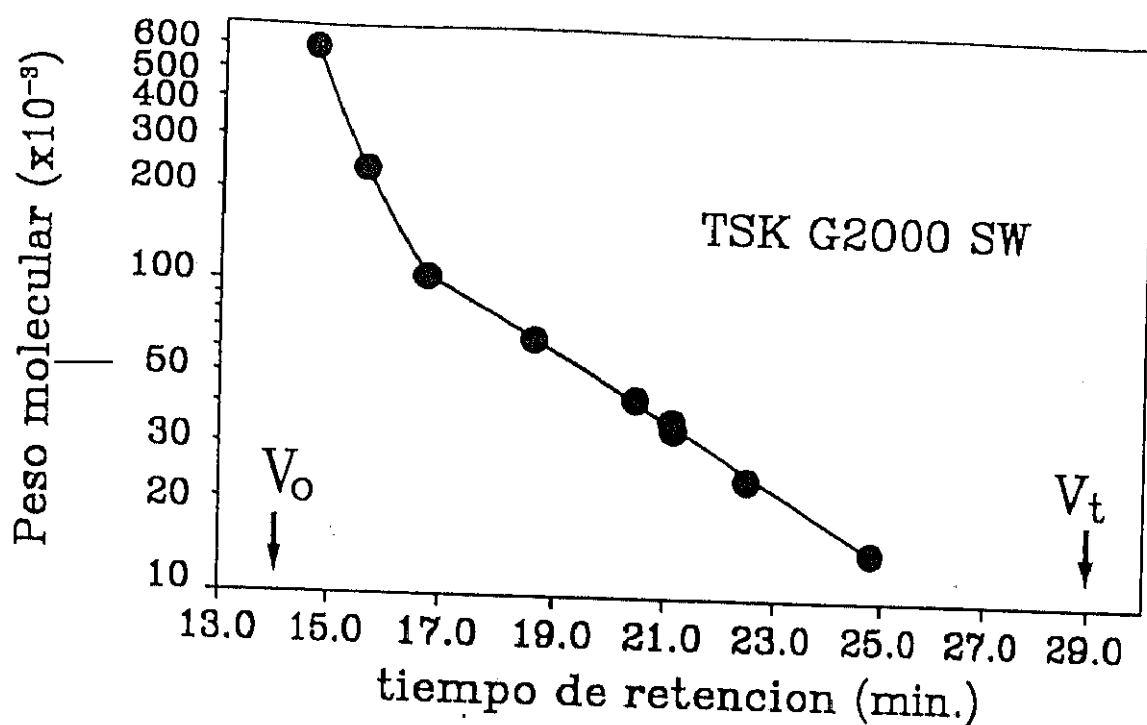


Figura 40.- Fraccionamiento mediante SE-HPLC de los proteolípidos extraídos por el OG. Arriba se muestra el cromatograma correspondiente a la proteína extraída por el OG 100 mM en tampón fosfato sódico 0.1 M, sulfato sódico 0.1 M, pH 6.7. Las fracciones recolectadas produjeron un único pico cuando se recromatografiaron en las mismas condiciones (a-d).



Fracción	tR \pm DS	Mr
a	14.47 \pm 0.26 (6)	ND
b	16.04 \pm 0.19 (4)	ND
c	17.86 \pm 0.21 (13)	79682
d	20.05 \pm 0.19 (12)	46170

Figura 41.- Pesos moleculares aparentes de las fracciones que se muestran en la Figura 40. Arriba, curva de calibrado del conjunto formado por la precolumna Progel-TSK SW conectada a la columna analítica Progel-TSK G2000 SW. V_o , volumen vacío; V_t , volumen de permeación total. Abajo, tiempos de retención (tR) y pesos moleculares aparentes (Mr) de las fracciones. ND, no determinables, por caer los tR en el intervalo no lineal de la curva de calibración. DS, desviación estándar. Los números entre paréntesis se refieren al número de determinaciones.

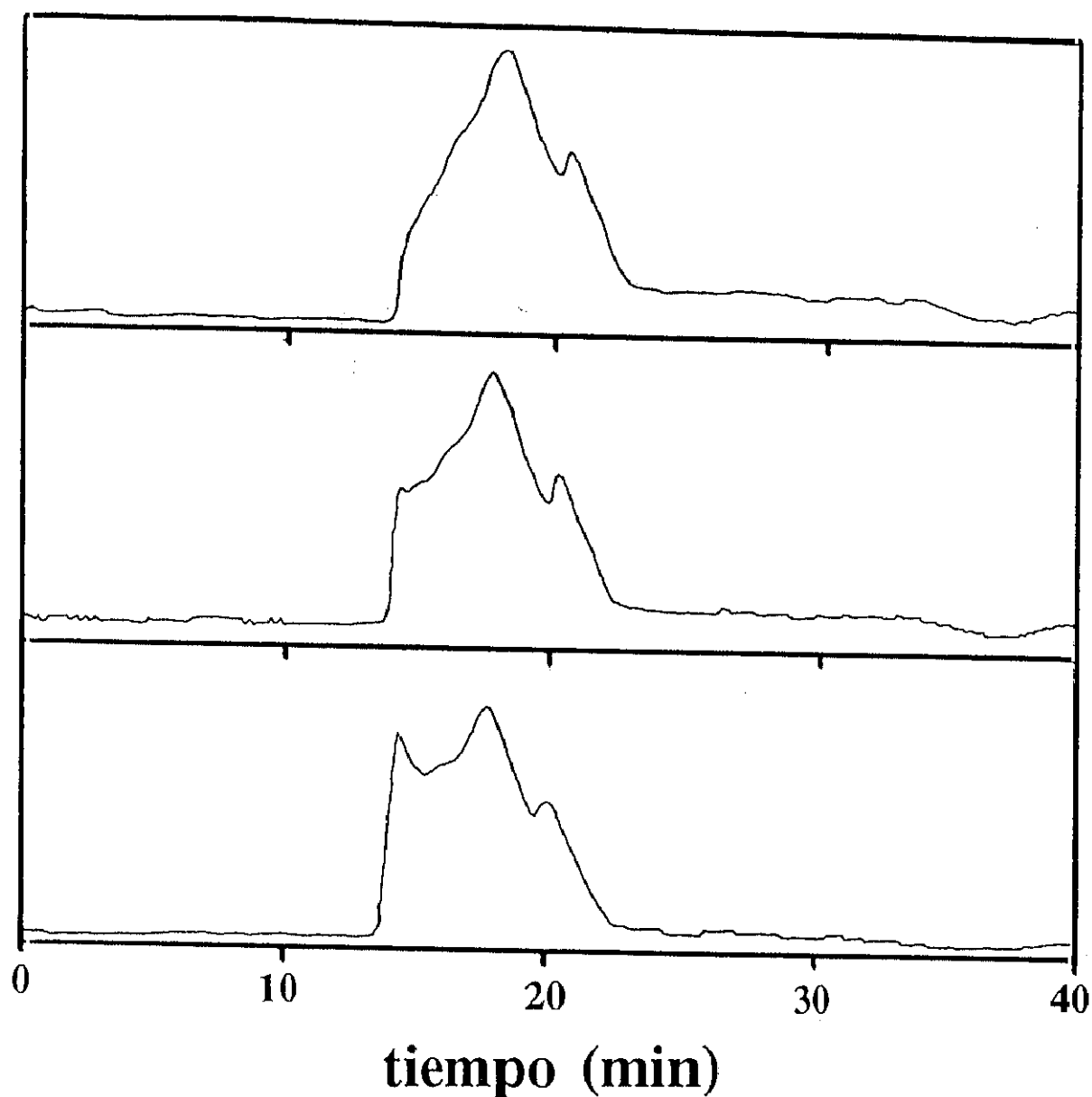


Figura 42.- Efecto de la temperatura en el estado oligomérico de los proteolípidos extraídos con OG. Arriba, cromatograma obtenido con los proteolípidos recientemente extraídos con OG 100 mM, a temperatura ambiente. Centro, la misma muestra enfriada toda la noche a 4 °C, y atemperada a temperatura ambiente antes de la inyección. Abajo, la misma muestra sometida a dos ciclos de enfriamiento. En los tres casos se inyectaron 120 μ g de proteína (escala de detección de 0.080 UA).

la precolumna, con proteínas de peso molecular conocido, se calcularon los pesos moleculares correspondientes a cada una de estas fracciones, mostrados en la Figura 41. Cada una de las fracciones aisladas se trataron con TCA al 10% como se describe en Materiales y Métodos, y la proteína precipitada se sometió a análisis electroforético. Los resultados, mostrados en las Figuras 43 y 44, demuestran que las cuatro fracciones tienen idéntica composición proteica: los dos proteolípidos mayoritarios de mielina (PLP y DM20), y una banda ancha migrando en la zona de alto peso molecular. El hecho de que la proteína total extraída con OG produzca un pico muy mayoritario de proteolípidos, y cantidades despreciables del resto de los componentes proteicos de la mielina (Figura 39), excluye la posibilidad de que esta banda intensa de alto peso molecular pudiera ser un componente de la fracción Wolfgram, e indica su naturaleza proteolipídica. La formación de agregados proteolipídicos de alto peso molecular durante el proceso de la electroforesis es un hecho bien conocido (ver, por ejemplo, Lees y Brostoff, 1984 (27)). Estos agregados comigran con las proteínas de la fracción Wolfgram en geles con una concentración de acrilamida del 14% (Figura 43), pero tienen una movilidad ligeramente mayor al de éstas cuando se utiliza un gradiente de concentración de acrilamida del 4-22% (Figura 44).

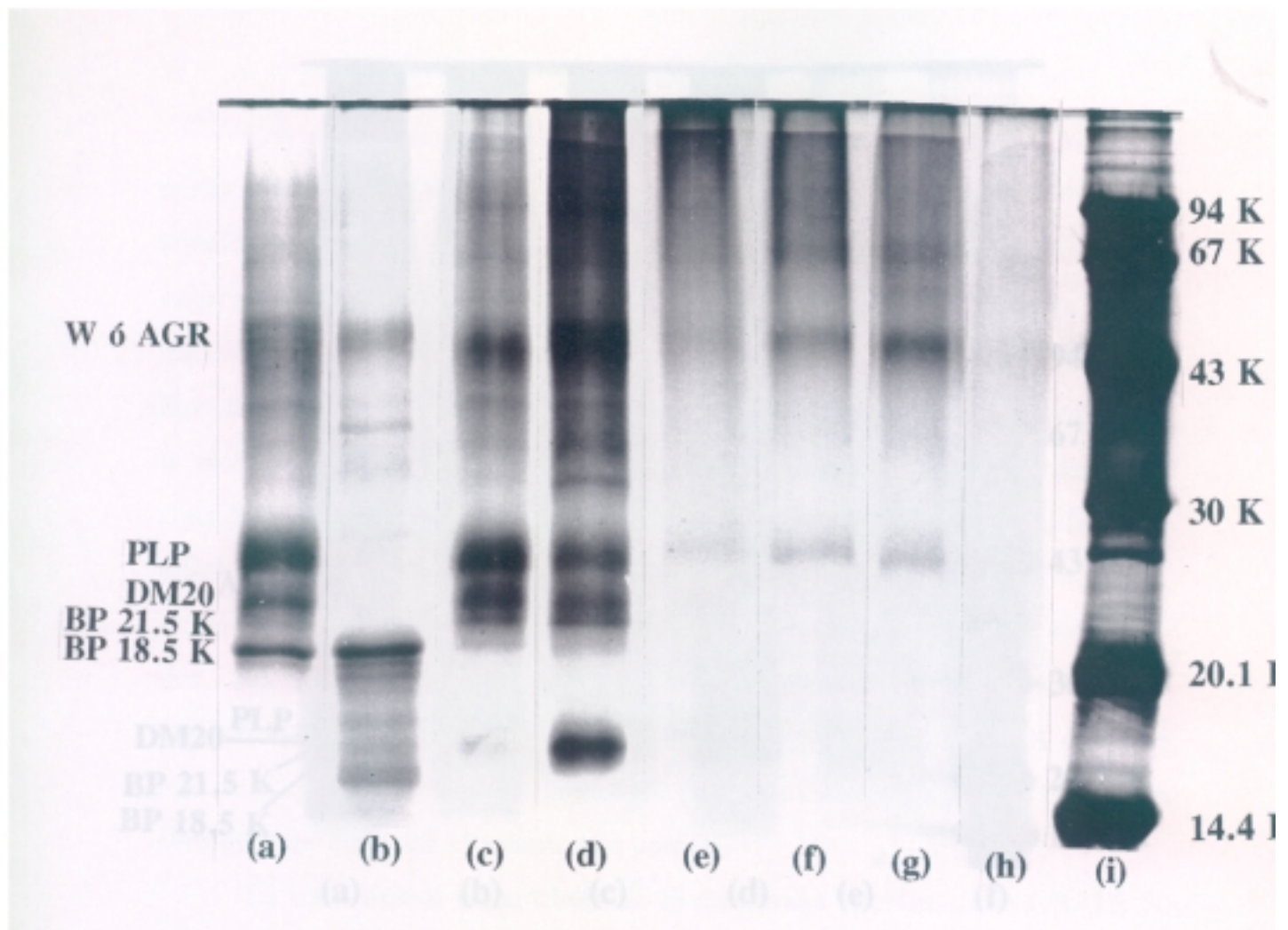


Figura 43.- Análisis electroforético de las proteínas presentes en cada una de las etapas de la delipidación secuencial y purificación de los proteolípidos de la mielina. Gel isocrático con 14% de acrilamida, revelado con plata. (a), mielina control (no delipidada); (b), proteína perdida en los tratamientos con CHAPS 30 mM (primer sobrenadante); (c), mielina delipidada por 6 tratamientos con CHAPS 30 mM en tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, a temperatura ambiente; (d), fracción de la mielina delipidada que es insoluble en OG 100 mM; (e)-(h), proteínas de la mielina delipidada que son solubles en OG 100 mM (fracciones a-d, respectivamente, recolectadas de la columna de SE-HPLC, como en la Figura 40); (i), proteínas patrón de peso molecular conocido.

Abreviaturas: W, proteínas de la fracción Wolfgram; AGR, agregados proteolípidos; BP, proteína básica.

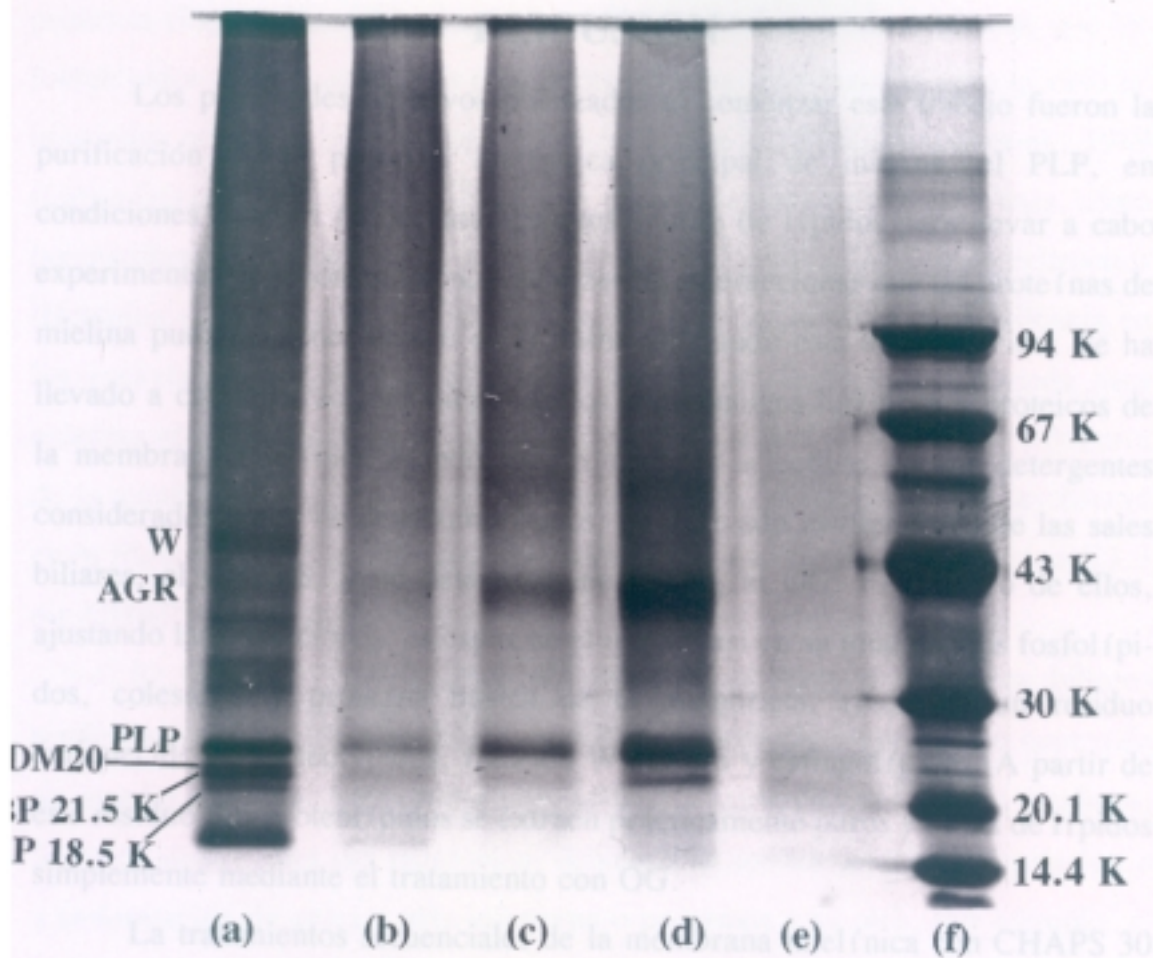


Figura 44.- Electroforesis de las proteínas de la mielina delipidada por CHAPS que son insolubles (a), o solubles (b)-(e) en OG 100 mM, sobre un gel en gradiente de acrilamida del 4-22%. En estas condiciones, la banda correspondiente a la fracción Wolfram (W) migra en diferente posición que los agregados proteolipídicos (AGR). Tinción con reactivo de plata. Las calles (b)-(e) corresponden a las fracciones a-d obtenidas a partir de la columna de SE-HPLC (ver Figura 40).

DISCUSION

Los principales objetivos planteados al comenzar este trabajo fueron la purificación de la proteína intrínseca principal de mielina, el PLP, en condiciones *a priori* no desnaturalizantes y libre de lípidos para llevar a cabo experimentos de reconstitución, y analizar las interacciones que las proteínas de mielina pudieran tener dentro de la vaina utilizando esta aproximación. Se ha llevado a cabo el fraccionamiento de los componentes lipídicos y proteicos de la membrana mielínica usando las propiedades selectivas de dos detergentes considerados como no desnaturalizantes: un derivado zwitteriónico de las sales biliares, el CHAPS, y un detergente no iónico, el OG. El primero de ellos, ajustando las condiciones, es capaz de eliminar casi en su totalidad los fosfolípidos, colesterol y proteína básica de la membrana, rindiendo un residuo enriquecido en proteolípidos, fracción Wolfgram y esfingolípidos. A partir de este residuo, los proteolípidos se extraen prácticamente puros y libres de lípidos simplemente mediante el tratamiento con OG.

La tratamientos secuenciales de la membrana mielínica con CHAPS 30 mM pone de manifiesto las diferencias de solubilidad de los distintos componentes lipídicos y proteicos que conforman esta membrana. En el estudio de solubilidad que se recoge en la primera parte de este capítulo se pudo comprobar que la concentración de 30 mM de este detergente es subóptima para la solubilización de la proteína, pero adecuada para la solubilización de los lípidos, especialmente los fosfolípidos (Ver Figura 24 y Tabla 7). A 25 °C y en tampón Tris-HCl 0.1 M (Figura 34) se consigue eliminar más del 95% de fosfolípidos y colesterol recuperando el 70% de la proteína total. El análisis electroforético de la proteína recuperada en cada uno de los pasos del tratamiento secuencial demuestra que la proteína perdida es, en su mayor parte, la proteína extrínseca mayoritaria de mielina, la proteína básica. Seis tratamientos con detergente en estas condiciones elimina prácticamente en su totalidad esta

proteína (Figura 34). El hecho de que el colesterol sea más resistente que los fosfolípidos a los tratamientos con detergentes ha sido descrito para el caso de la mielina con otros surfactantes, como el Triton X-100 (Gillespie et al., 1989 (16)) u OG (Aveldaño et al., 1991 (28)), y en el caso de otras membranas, como las membranas de plaquetas humanas (Shiao et al., 1989 (21)), o de eritrocitos (Helenius y Simons, 1975 (8)). Con la cantidad de proteína total utilizada en los ensayos, la concentración 30 mM de CHAPS es la más adecuada para alcanzar el doble objetivo de casi total eliminación de fosfolípidos y colesterol de la membrana, y la casi total depleción de proteína básica, como se observa en la Figura 33, aun cuando supone una alta relación detergente/proteína (21.3 mg CHAPS/mg proteína en las condiciones iniciales del ensayo).

El CHAPS tiene la gran ventaja, con respecto a las sales biliares tradicionales como el colato sódico o el DOC, de poder ser utilizado dentro de un amplio rango de pHs. Estas son utilizadas generalmente a pHs alcalinos, bastante alejados del pH fisiológico, debido a su tendencia a la precipitación o a la formación de geles a pHs inferiores o próximos a su pKa. Por ejemplo, el DOC ha sido utilizado para extraer proteolípidos de mielina a un pH de 9.6 (Smith et al., 1984 (29)). El pH, sin embargo, no parece tener una gran influencia sobre la extractabilidad de los distintos componentes de la membrana mielínica con CHAPS, como se aprecia en la Figura 36. Los fosfolípidos se eliminan de igual manera dentro del intervalo estudiado (5.5-8.5), pero se recupera menos proteína a pHs ácidos.

Las dos sales biliares colato sódico y DOC, y el derivado de las mismas CHAPS, se compararon a concentraciones equimolares (30 mM) en su capacidad de delipidación de la mielina purificada a un pH de 7.4 (en el cual colato y DOC se mantienen en solución) y a dos diferentes concentraciones de fuerza iónica: 20 y 100 mM Tris-HCl (Figura 32). A pesar de su gran semejanza estructural, el colato sódico y el DOC producen resultados muy distintos. El primero es

bastante ineficaz como delipidizante de la membrana, especialmente del colesterol, y también como solubilizador de proteína, a juzgar por la alta recuperación alcanzada. El DOC, por el contrario, parece buen solubilizante de proteínas de mielina y mejor solubilizante de fosfolípidos y colesterol que el colato. De los tres detergentes es el CHAPS el que se ajusta mejor al propósito de obtener la mayor recuperación de proteína altamente delipidada. La fuerza iónica del tampón en que se disuelve el detergente también parece influir en los resultados obtenidos con los tres surfactantes estudiados. El aumento en la concentración del tampón Tris-HCl desde 20 hasta 100 mM, a idéntico pH, se traduce en un mayor grado de delipidación de colesterol y fosfolípidos en los tres casos, y una ligeramente menor recuperación de proteína en el caso del CHAPS y el colato sódico. El DOC, sin embargo, parece más efectivo en la solubilización de la proteína en un medio de baja fuerza iónica; de hecho, este detergente se disuelve más rápidamente en Tris-HCl 20 mM que en Tris-HCl 100 mM. Quizás algún componente del tampón pueda modificar algún parámetro propio de este detergente, que influya en la formación de los complejos detergente-proteína.

El efecto observado es explicable si se considera que la concentración micelar crítica (CMC) de los detergentes disminuye, especialmente con detergentes iónicos, al aumentar la fuerza iónica del medio. Por tanto, a idéntica concentración molar, existe mayor número de micelas disponibles para su interacción con la membrana a medida que la fuerza iónica del medio aumenta. Otras interpretaciones también son posibles. Por ejemplo, la presencia de iones Cl^- en el medio podría inducir un efecto *salting-in* al desorganizar inespecíficamente la membrana. Esta posibilidad, sin embargo, no parece muy razonable en vista del escaso poder caotrópico de estos iones (Hatefi y Hanstein, 1969 (30)). Aparte del efecto inespecífico que la fuerza iónica pueda ejercer sobre las propiedades físico-químicas del detergente en solución, algunos iones pueden

afectar las interacciones proteína-proteína o lípido-proteína que tienen lugar en la membrana nativa, provocando diferencias cualitativas en la partición de algunas proteínas entre la fase acuosa con detergente y el residuo insoluble. Tal es el caso del KCl, que aumenta la partición de los proteolípidos en la fase acuosa con detergente, y el $MgCl_2$, que facilita la disociación de las interacciones lípido-proteína (Pereyra et al., 1988 (2)). De hecho, algunas proteínas, las extrínsecas, pueden extraerse a partir de la membrana sin uso de detergentes, simplemente con tampones que incluyan concentraciones moderadas de algún ión. Por ejemplo, la proteína básica de mielina ha sido extraída de la membrana con soluciones acuosas de $CaCl_2$ (Gow y Smith, 1989 (31)).

La temperatura de incubación también tiene influencia sobre la extractabilidad de los distintos componentes de la membrana, como se puede apreciar si se comparan las Figuras 34 y 35. Al disminuir simultáneamente la temperatura (hasta 0-4 °C) y la fuerza iónica del tampón (hasta 20 mM) (Figura 35), se requieren un mínimo de 6 tratamientos con CHAPS 30 mM para obtener un grado de delipidación similar al conseguido a temperatura ambiente y tampón 0.1 M Tris-HCl con 4 tratamientos (Figura 34). Se sabe que una disminución en la temperatura produce un aumento en la CMC de los detergentes, por lo que, a la misma concentración de surfactante, hay mayor número de micelas disponibles cuanto mayor es la temperatura. En nuestro caso, la disminución de los dos parámetros (temperatura y fuerza iónica del tampón) también se traduce en una menor eliminación de la isoforma principal de la proteína básica (18.5 KDa). Este hecho puede ser útil si se pretende únicamente delipidar la membrana. Sin embargo, si el objetivo es el de fraccionar al mismo tiempo las proteínas de la mielina, puede ser interesante eliminar de una manera tan sencilla esta proteína extrínseca.

Para confirmar los resultados de delipidación, y determinar cuáles son los lípidos residuales no extraídos por los tratamientos con CHAPS, se analizó por

HPTLC la composición de una muestra de mielina delipidada por seis tratamientos con CHAPS 30 mM en las condiciones establecidas para la Figura 35 (4 °C, 20 mM Tris-HCl). Los resultados (Figura 37) concuerdan bien con las estimaciones cuantitativas: casi total eliminación de fosfolípidos y gran eliminación de colesterol (el colesterol residual, en estas condiciones de delipidación, es alrededor del 10% respecto al control; Figura 35). Sin embargo, el hecho más significativo fue la presencia de glicosfingolípidos, sobre todo cerebrósidos, en cantidades casi comparables a las del control (mielina no delipidada). Interesantemente, el único fosfolípido residual detectado fue la esfingomielina, otro esfingolípido. Además son detectables pequeñas cantidades de sulfátidos, y una banda no identificada, que podría corresponder a alguno de los ésteres de ácidos grasos y cerebrósido presentes en mielina (Norton y Cammer, 1984 (32)), de acuerdo a varias evidencias experimentales: la mancha es ligeramente positiva al reactivo de orcinol, específico para glicolípidos; no aparece cuando las muestras se desarrollan exclusivamente en el solvente para lípidos polares (lo cual puede significar que la banda comigra con alguna de las bandas de cerebrósido), y se desdobra sólo cuando se realiza el segundo desarrollo para lípidos neutros. Además, la banda aparece también en la calle correspondiente a los lípidos estándar, y ninguno de los lípidos neutros incluidos en la misma, cromatografiados por separado con el doble desarrollo, produce ninguna banda detectable con la misma movilidad (resultados no mostrados), sugiriendo que debe proceder de alguno de los lípidos polares incluidos en la mezcla, probablemente de los cerebrósidos patrón. Además, como se demuestra en la Figura 37, este lípido no identificado no parece extraerse con el CHAPS, y tiene, por tanto, unas propiedades de solubilidad semejantes a las de los esfingolípidos.

La resistencia que muestran los esfingolípidos a ser extraídos por CHAPS es parecida a la que muestran hacia los detergentes no iónicos, como el Triton

X-100 (Gillespie et al., 1989 (16); Pereyra et al., 1988 (2)) o el OG (Avelaño et al., 1991 (28)). Estos detergentes no son capaces de romper las fuertes interacciones proteína-proteína y lípido-proteína que tienen lugar entre las proteínas y lípidos que conforman o interactúan con el citoesqueleto de la vaina de mielina, lo que se ha dado en llamar componente radial (uniones estrechas interlamelares) o complejo de unión (*junctional complex*) (Kosaras y Kirschner, 1990 (3)), estructuras visibles al microscopio electrónico como zonas recurrentes electrónicamente densas, localizadas en las líneas intraperiódicas (espacios extracelulares dentro de la mielina compacta). Las proteínas que componen esta matriz citoesquelética o interactúan con ella parecen ser la CNPasa, actina, tubulina, glicoproteína asociada a mielina (MAG), etc, es decir, proteínas de la fracción Wolfgram de mielina y otras de alto peso molecular. Los métodos empleados para aislar el componente citoesquelético a partir de mielina purificada, tales como la extracción con Triton X-100, proporcionan un residuo insoluble muy enriquecido en estas proteínas de alto peso molecular, y asociadas con lípidos específicos: glicosfingolípidos y esfingomielina (Gillespie et al., 1989 (16)). Estos lípidos permanecen unidos a la proteína citoesquelética incluso tras el fraccionamiento del residuo insoluble en Triton X-100 por centrifugación en gradiente continuo de sacarosa, por lo que deben de estar genuinamente asociados a los componentes citoesqueléticos de la mielina compacta.

Las gráficas de delipidación y fraccionamiento proteico con CHAPS pueden interpretarse en términos de mayor o menor afinidad de las distintas clases lipídicas o moléculas proteicas hacia el detergente, pero existen interpretaciones adicionales al considerar la distribución asimétrica de lípidos y proteínas entre las dos hemicapas que integran la bicapa mielínica (Braun, 1984 (33)). A partir de resultados biofísicos, de difracción de rayos X, se sabe que los glicosfingolípidos (cerebrósidos, sulfátidos y gangliósidos) se localizan

preferentemente, o exclusivamente, en las hemicapas extracelulares (la aposición de las cuáles forman la línea intraperiódica vista en las micrograffas electrónicas de la vaina de mielina). Los glicerofosfolípidos, sin embargo, se localizan preferentemente en las hemicapas citoplasmáticas (que forman las líneas densas). El colesterol se distribuye entre las dos hemicapas, pero de forma asimétrica: dos de cada tres moléculas se localizan en la hemicapa extracelular. Las proteínas tampoco se distribuyen aleatoriamente entre las dos hemicapas. Es conocida la localización citoplasmática de la proteína básica de mielina, que contribuye a la alta densidad electrónica de la línea densa principal, y donde interactúa con los fosfolípidos de la membrana externa. Esta interacción ha sido caracterizada para fosfolípidos acídicos y neutros (Menon et al., 1990 (34)).

Tomando todas estas evidencias en su conjunto, y analizando los datos experimentales de delipidación con CHAPS, parece como si este detergente, en las condiciones utilizadas en el presente trabajo, solubilizara preferentemente las hemicapas citoplasmáticas y las proteínas que interactúan con ellas (principalmente la proteína básica). Las líneas intraperiódicas, en las cuáles es observable el componente radial, quedarían relativamente inalteradas por el tratamiento con CHAPS, y ello explicaría la escasa extractabilidad de los glicoesfingolípidos y de las proteínas de alto peso molecular. Los proteolípidos, de naturaleza intrínseca transmembrana, podrían quedar anclados en las hemicapas extracelulares y retenidos en los residuos insolubles en el CHAPS. Por otra parte, la mayor resistencia del colesterol a ser solubilizado por el detergente también podría explicarse al estar en mayor proporción en las hemicapas extracelulares.

No todos los detergentes muestran la misma selectividad en la extracción de componentes mielínicos mostrada por el CHAPS. Los detergentes fuertemente iónicos, como el SDS, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTA) o DOC parecen solubilizar los galactolípidos de mielina tan eficazmente como los fosfolípidos

(McIlwain et al., 1971 (5)). En los ensayos de solubilidad que se recogen en la sección anterior de este capítulo, de los siete detergentes probados, sólo los detergentes no iónicos (OG, Triton X-100 y Lubrol PX) y el CHAPS dejaron un residuo insoluble muy enriquecido en proteínas de alto peso molecular (Figura 28).

Los tratamientos secuenciales con CHAPS dejan un residuo insoluble con una composición proteica virtualmente idéntica a la de mielina no delipidada pero prácticamente carente de la isoforma mayoritaria (18.5 KDa) de la proteína básica. Conocida la insolubilidad de los complejos lípido-proteína y proteína-proteína que forman el citoesqueleto de la mielina del sistema nervioso central, la mielina delipidada por CHAPS se extrajo con varias concentraciones de OG en tampón fosfato sódico 0.1M pH 6.8 conteniendo sulfato sódico 0.1 M (condiciones óptimas de solubilización con este detergente) con la esperanza de que las únicas proteínas solubilizadas fueran los proteolípidos. La Figura 38 muestra los resultados en comparación con otro detergente ampliamente utilizado en la solubilización de proteínas de mielina, el DOC. Este último, paradójicamente, no es capaz de extraer cantidades apreciables de proteína, ni siquiera a altas concentraciones (100 mM), mientras que cuatro tratamientos con DOC, en las mismas condiciones de pH y tampón y a baja concentración (30 mM), extrae alrededor de un 60% de la proteína total de la membrana no delipidada (Figura 32). Aunque la causa de este fenómeno es desconocida, pudiera ser que este detergente necesite la presencia de fosfolípidos para extraer cantidades apreciables de proteolípidos. El OG, sin embargo, extrae cantidades sustanciales de proteína a partir de mielina delipidada, incluso a la más baja concentración empleada (30 mM), que llega a ser del 70% a una concentración de 100 mM. La Figura 39 demuestra que la proteína extraída a todas las concentraciones es casi exclusivamente de naturaleza proteolipídica; el residuo insoluble en la concentración más alta de OG usada (100 mM) está muy enriquecida en proteínas de alto

peso molecular (Figuras 43-44). Además, el análisis de los lípidos extraídos en estas condiciones reveló que los glicolípidos permanecen en su gran mayoría en el residuo insoluble en OG. Combinando la delipidación secuencial con CHAPS y la extracción con OG, se consiguen purificar los proteolípidos en su estado altamente delipidado (apoproteolípidos).

Se investigó posteriormente el posible estado oligomérico de los proteolípidos purificados. La cromatografía de exclusión molecular, haciendo uso de detergentes no desnaturizantes, es uno de los métodos de elección para determinar si varios polipéptidos pueden formar complejos supramoleculares (Tandford y Reynolds, 1976 (20)). En el presente trabajo se utilizó la técnica de SE-HPLC, usada con éxito para purificar otras proteínas intrínsecas de membrana, tales como la bacteriorrodopsina o la rodopsina (Muccio y DeLucas, 1985 (18); DeLucas y Muccio, 1984 (17)). Se obtuvieron cuatro fracciones, que recromatografiadas producen un único pico (Figura 40). El hecho de que las fracciones tengan idéntica composición proteica (PLP, DM-20 y agregados proteolipídicos de alto peso molecular) (Figuras 43-44), y que eluyan a tiempos de retención muy distintos (Figura 41) sugiere que las dos isoformas pueden interactuar formando complejos heteromoleculares, condición ésta que podría configurar la estructura cuaternaria de los proteolípidos dentro de la vaina de mielina. Los pesos moleculares aparentes de las fracciones, obtenidos por comparación con los tiempos de retención de proteínas patrón de peso molecular conocido (Figura 41) parecen indicar que varios estados oligoméricos coexisten en la solución de proteolípidos en OG. Todos estos resultados parecen indicar que los dos proteolípidos mayoritarios de mielina, ambos codificados por el mismo gen, consecuencia de cortes y empalmes alternativos del producto de transcripción primario (Campagnoni et al., 1988 (35)), podrían formar parte *in vivo* de un oligómero de estructura cuaternaria definida, aunque los resultados presentados aquí no permiten deducir su estequiometría. Sin embargo, como se

ilustra en la Figura 42, la temperatura parece influenciar el estado oligomérico de las proteínas en solución, favoreciéndose la formación de la fracción de mayor peso molecular. El efecto puede ser debido al aumento de la CMC del OG en la solución de la proteína. En último término sería un efecto análogo al de disminuir la concentración de detergente en la solución, lo cual favorecería la oligomerización. Parece, pues, que el estado más estable termodinámicamente es el oligómero de mayor peso molecular. La concentración relativamente alta de detergente (100 mM) en el que va disuelta la proteína puede disociarlo reversiblemente en subunidades de menor peso molecular, que pueden reasociarse si la concentración efectiva de detergente disminuye, por ejemplo, por disminución de la temperatura.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Sedzik J., Toews A.D., Blaurock A.E. y Morell P. (1984). *Resistance to disruption of multilamellar fragments of central nervous system myelin.* **J. Neurochem.** 43:1415-1420.
- 2.- Pereyra P.M., Horvath E. y Braun P.E. (1988). *Triton X-100 extractions of central nervous system myelin indicate a possible role for the minor myelin proteins in the stability of lamellae.* **Neurochem. Res.** 13:583-595.
- 3.- Kosaras B. y Kirschner D.A. (1990). *Radial component of CNS myelin: junctional subunit structure and supramolecular assembly.* **J. Neurocytol.** 19:187-199.
- 4.- Eng L.F., Chao F.-C., Gerstl B., Pratt D. y Tavaststjerna M.G. (1968). *The maturation of human white matter myelin. Fractionation of the myelin membrane proteins.* **Biochemistry** 7:4455-4465.
- 5.- McIlwain D.L., Graf L. y Rapport M.M. (1971). *Membrane fragments from myelin treated with different detergents.* **J. Neurochem.** 18:2255-2263.
- 6.- Aguilar J.S., de Cózar M., Criado M. y Monreal J. (1982). *Method for lyophilizing brain proteolipid preparations that increases subsequent solubilization by detergents.* **J. Neurochem.** 39:1733-1736.
- 7.- Jones O.T., Earnest J.P. y McNamee M.G. (1987). *Solubilization and reconstitution of membrane proteins.* En (Findlay J.B.C. y Evans W.H., eds): **Biological membranes. A practical approach.** Oxford, IRL Press. Pp:139-177.
- 8.- Helenius A. y Simons K. (1975). *Solubilization of membranes by detergents.* **Biochim. Biophys. Acta** 415:29-79.
- 9.- Szundi I. y Stoeckenius W. (1987). *Effect of lipid surface charges on the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84:3681-3684.
- 10.- Seigneuret M., Neumann J.M. y Rigaud J.L. (1991). *Detergent delipidation and solubilization strategies for high-resolution NMR of the membrane protein bacteriorhodopsin.* **J. Biol. Chem.** 266:10066-10069.
- 11.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). *Protein measurement with de Folin phenol reagent.* **J. Biol. Chem.** 193:265-275.

- 12.- Ames B.N. y Dubin D.T. (1960). *The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid*. **J. Biol. Chem.** 235:769-775.
- 13.- Siedel J., Schlumberger H., Klose S., Ziegenhorn J. y Wahlefeld A.W. (1981). *Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol*. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** 19:838-839.
- 14.- Laemmli U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. **Nature** 227:680-685.
- 15.- Raso M.A., Tortajada J., Escolar D. y Accion F. (1987). *A general fitting program for resolution of complex profiles*. **Comput. Chem.** 11:125-135.
- 16.- Gillespie C.S., Wilson R., Davidson A. y Brophy P.J. (1989). *Characterization of a cytoskeletal matrix associated with myelin from rat brain*. **Biochem. J.** 260:689-696.
- 17.- DeLucas L.J. y Muccio D.D. (1984). *Purification of bovine rhodopsin by high-performance size-exclusion chromatography*. **J. Chromatogr.** 296:121-128.
- 18.- Muccio D.D. y DeLucas L.J. (1985). *Isolation of detergent-solubilized monomers of bacteriorhodopsin by size-exclusion high-performance liquid chromatography*. **J. Chromatogr.** 326:243-250.
- 19.- Amey R.L. y Chapman D. (1983). *Infrared spectroscopic studies of model and natural biomembranes*. En (Chapman D., ed.): **Biomembrane structure and function. Topics in molecular and structural biology**, 4. Londres.
- 20.- Tandford C. y Reynolds J. (1976). *Characterization of membrane proteins in detergent solutions*. **Biochim. Biophys. Acta** 457:133-170.
- 21.- Shiao Y.-J., Chen J.-C. y Wang C.-T. (1989). *The solubilization and morphological change of human platelets in various detergents*. **Biochim. Biophys. Acta** 980:56-68.
- 22.- Racker E. (1973). *A new procedure for the reconstitution of biologically active phospholipid vesicles*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 55:224-230.
- 23.- Mimms L.T., Zampighi G., Nozaki Y., Tandford C. y Reynolds J.A. (1981). *Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octylglucoside*. **Biochemistry** 20:833-840.

- 24.- Ayala G., Carmona P., de Cózar M. y Monreal J. (1987). *Vibrational spectra and structure of myelin membranes*. **Eur. Biophys. J.** 14:219-225.
- 25.- Autilio L.A. y Norton W.T. (1963). *Non-aqueous solvent extracts of lyophilized bovine brain white matter*. **J. Neurochem.** 10:733-738.
- 26.- Folch J., Lees M. y Sloane-Stanley G. (1957). *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. **J. Biol. Chem.** 226:497-509.
- 27.- Lees M.B. y Brostoff S.W. (1984). *Proteins of myelin*. En (Morell P., ed.): **Myelin, 2nd Edition**. Plenum Press, Nueva York. Pp: 197-224.
- 28.- Aveldaño M.I., Díaz R.S., Regueiro P. y Monreal J. (1991). *Solubilization of myelin membranes by detergents*. **J. Neurochem.** 57:250-257.
- 29.- Smith R., Cook J. y Dickens P.A. (1984). *Structure of the proteolipid protein extracted from bovine central nervous system myelin with nondenaturing detergents*. **J. Neurochem.** 42:306-313.
- 30.- Hatefi Y. y Hanstein W.G. (1969). *Solubilization of particulate proteins and nonelectrolytes by chaotropic agents*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 62:1129-1136.
- 31.- Gow A. y Smith R. (1989). *The thermodynamically stable state of myelin basic protein in aqueous solution is a flexible coil*. **Biochem. J.** 257:535-540.
- 32.- Norton W.T. y Cammer W. (1984). *Isolation and characterization of myelin*. En (Morell P., ed.): **Myelin, 2nd Edition**. Nueva York, Plenum Press. Pp: 147-195.
- 33.- Braun P.E. (1984). *Molecular organization of myelin*. En (P. Morell, ed.): **Myelin, 2nd Edition**. Plenum Press, Nueva York. Pp: 97-116.
- 34.- Menon N.K., Williams R.E., Kampf K. y Campagnoni A.T. (1990). *An analysis of the regions of the myelin basic protein that bind to phosphatidylcholine*. **Neurochemical Research** 15:777-783.
- 35.- Campagnoni A.T. (1988). *Molecular biology of myelin proteins from the central nervous system*. **J. Neurochem.** 51:1-14.

CAPITULO V

EXTRACCION DE LOS LIPIDOS TOTALES DE MIELINA
LIBRES DE PROTEINA
PREPARACION Y CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS

INTRODUCCION

Una vez alcanzado el objetivo de la purificación de las proteínas de mielina, especialmente de los proteolípidos (capítulos III y IV), se abordó el problema de la obtención de un sustrato lipídico adecuado para su reconstitución, con el fin de analizar sus propiedades funcionales. Durante los últimos años las membranas modelo, en particular los liposomas, se han convertido en una herramienta poderosa para estudiar las interacciones lípido-proteína (Brown et al., 1989 (1)), así como la participación de las proteínas de membrana en la regulación de los niveles iónicos por medio de experimentos de reconstitución (Cózar et al., 1987 (2); Jones et al., 1988 (3)). Para algunas proteínas de membrana, tales como los canales iónicos o proteínas de transporte, los sistemas reconstituidos ofrecen grandes ventajas para definir y ensayar su función en la membrana.

La composición lipídica de los liposomas que han sido empleados en los estudios de reconstitución con las proteínas de mielina difiere considerablemente de la composición lipídica de esta membrana, a pesar de que algunos lípidos se han mostrado esenciales en los mecanismos de translocación iónica o en la modulación de la actividad de enzimas y receptores de membrana (McCormick y Johnstone, 1988 (4); Chakrabarti et al., 1990 (5)). Así, para probar el papel funcional de las proteínas de mielina, es preferible un entorno lipídico semejante al de las condiciones nativas, en vez del proporcionado por un único lípido sintético o lípidos procedentes de otras fuentes naturales, tales como los extractos lipídicos de soja (asolectina). Por tanto, un método que permita la extracción de los lípidos totales de mielina, libres de proteínas contaminantes (para evitar interferencias negativas en los estudios de reconstitución), con el objetivo de preparar liposomas, tiene una especial relevancia.

La extracción con mezclas de cloroformo y metanol (CM) es el procedi-

miento general para preparar extractos lipídicos totales a partir de sustancia blanca de cerebro (Folch et al., 1957 (6)), pero tiene el inconveniente de coextraer una considerable cantidad de proteína, principalmente proteolípidos (20 mg de proteína por gramo de tejido fresco). Por tanto, el hallazgo de un buen disolvente de lípidos que no co-extraiga cantidades significativas de proteína a partir del tejido es de gran interés, porque permitiría la obtención de extractos lipídicos adecuados para la formación de liposomas en los cuáles estudiar las propiedades de permeabilidad de la matriz lipídica de la vaina de mielina, además de poder ser usados como soporte para la reconstitución y el análisis funcional de las proteínas de esta membrana. Los hallazgos descritos en el capítulo III indicaban que el tetrahidrofurano (THF), minimizando la concentración de agua en el medio, extrae cantidades muy pequeñas de proteína a partir de la mielina purificada o de la sustancia blanca de cerebro (ver Figuras 10 y 11, páginas 117 y 120, respectivamente), y especialmente a partir de ésta última. Por otra parte, se conoce desde hace tiempo que la capacidad de extracción lipídica del THF es prácticamente comparable a la del CM 2:1 v/v (Autilio y Norton, 1963 (7)). Con estas premisas, se ha puesto a punto un método para la obtención de un extracto cuya composición cualitativa y cuantitativa es prácticamente indistinguible de la composición lipídica de la membrana mielínica, pero prácticamente libre de proteína. A partir de este extracto se han preparado liposomas, que han servido como modelo para examinar las propiedades de permeabilidad de la matriz lipídica de la membrana nativa.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Los cerebros de vaca se obtuvieron de animales sacrificados en el momento en el matadero municipal de Madrid, y se transportaron al laboratorio en baño de hielo. La sustancia blanca se diseccionó, se lavó con NaCl al 0.9% y se usó inmediatamente, o bien se liofilizó y pulverizó, conservándose en atmósfera de nitrógeno y con gel de sílice a -30°C hasta su uso. El tetrahidrofurano (THF), libre de hidroxitolueno butilado (BHT), se obtuvo de Probus. Se usó como tal para fines analíticos, ya que el BHT interfiere fuertemente con la determinación de proteína. Sin embargo, para preparar rutinariamente los extractos lipídicos totales (ELT), se incluyó un 0.025% de BHT (Sigma) en el solvente para evitar la peroxidación lipídica. La celita (Cellite^R 503) se adquirió de J.T. Baker (Holanda). Los productos radioactivos ($^{45}\text{CaCl}_2$, $^{86}\text{RbCl}$, [^{14}C]-sacarosa y [^{14}C]-metilamina) se compraron a Amersham (Reino Unido). Los ionóforos valinomicina y A23187 fueron de Boehringer Mannheim (Alemania). El ionóforo FCCP, la nigericina, la monensina, la 9-aminoacridina y el cloruro de colina se obtuvieron de Sigma (EEUU). El Sephadex G-25 fue de Pharmacia (Suecia). La L-dimiristoil-alfa-fosfatidilcolina (DML), y los fosfolípidos, glicolípidos y colesterol patrones se obtuvieron de Sigma o Fluka (Suiza). El ácido N-acetil-neuramínico (NANA) y los gangliósidos patrones se obtuvieron de Sigma, excepto el GD_{1b} , que fue de Calbiochem (EEUU).

Preparación de los extractos lipídicos totales

Para optimizar el método de extracción lipídica, cantidades de 250 mg de sustancia blanca liofilizada, o 960 mg de sustancia blanca fresca (250 mg de peso seco) se trataron con diferentes volúmenes de THF durante una hora a temperatura ambiente, en matraces de vidrio con agitación magnética moderada. Tras ello, los extractos se filtraron a través de una capa de 0.5 cm de celita,

dispuesta sobre un embudo de vidrio fritado, con la ayuda de un vacío moderado procedente de una trompa de agua. Cada filtrado se recogió, se concentró en un rotaevaporador a vacío, se añadió un 25% de agua destilada, se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó. El liofilizado obtenido se pesó, y se determinó su contenido en proteína.

Para extracciones a gran escala, 30 g de sustancia blanca liofilizada se trataron con 1500 ml de THF (50 ml de THF por g de tejido seco) en un Erlenmeyer de dos litros de capacidad, en las condiciones descritas arriba. Tras filtrar a través de celita, el filtrado se concentró hasta la décima parte de su volumen original y se le añadió un 25% de agua destilada. La mezcla se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó. El liofilizado, de color totalmente blanco, se conservó a -30°C en atmósfera de nitrógeno, con gel de sílice como desecante.

Caracterización analítica del extracto lipídico total (ELT)

La determinación de proteína en los ELT se realizó por el método de Lowry et al., 1951 (8)), modificado para eliminar la turbidez producida por el alto contenido lipídico de las muestras. Brevemente, 15 mg de ELT se disolvieron en 1 ml de SDS al 2.5% en Na_2CO_3 al 1%, con ayuda de un sonicador de baño (Bransonic), y un baño hirviente durante 10 minutos. Se tomaron alícuotas de 100 μl de esta solución (1.5 mg de ELT) para la determinación de proteína por el método de Lowry, incluyendo un 3% de SDS en el reactivo C (Aguilar et al., 1982 (9)). Una vez que se desarrolló el color, la turbidez de las muestras se eliminó añadiendo a los tubos 0.5 ml de cloroformo, como recomiendan Norton y Autilio, 1966 (10). Se agitaron los tubos en un *vortex* y se centrifugaron a 500 g durante 5 minutos. El color permanece íntegramente en la fase superior acuosa, y se leyó a 750 nm. Como patrón se utilizó seroalbúmina bovina. Los tubos conteniendo la solución patrón de

proteína se trataron de una manera idéntica al resto de las muestras.

El fósforo lipídico se determinó por el método de Ames and Dubin, 1960 (11). El colesterol se determinó por el método de Siedel et al., 1981 (12). Los galactolípidos (sulfátidos y cerebrósidos) se evaluaron determinando el contenido en galactosa mediante la reacción de la antrona de Trevelyan y Harrison, 1952 (13). Debido a las grandes interferencias de la mayoría de los lípidos, especialmente del colesterol y los ácidos grasos poliinsaturados con este método (Kishimoto, 1978 (14)), los galactolípidos se purificaron previamente por cromatografía en capa fina (TLC) (Vitiello y Zanetta, 1978 (15)) sobre placas de vidrio precubiertas con gel de sílice 60 (Merck, Alemania). Las manchas correspondientes a cerebrósidos y sulfátidos se rasparon de la placa, se eluyeron con cloroformo/metanol/agua 5:5:1 y se determinó su contenido en galactosa. Como controles se usaron blancos de silicagel. El contenido en galactolípido se expresa como $4.6 \times \% \text{ galactosa}$ (Autilio y Norton, 1963 (7)).

El ácido siálico unido a gangliósidos se determinó por el método de Warren, 1959 (16), modificado por Chaplin, 1986 (17), usando NANA como patrón. Las muestras de ELT (300 mg) se hidrolizaron previamente con 4 ml de H_2SO_4 0.1 N durante una hora a 80 °C.

Cromatografía en capa fina de lípidos polares

La composición de lípidos polares del ELT se examinó sobre placas de cromatografía en capa fina de alta eficacia (HPTLC, 10 cm x 10 cm) precubiertas con gel de sílice 60 F254 (Merck).

Para la HPTLC monodimensional de lípidos polares, el ELT se disolvió en CM 2:1 y se aplicó en la placa formando una banda de 0.8 cm con la ayuda de una jeringa Hamilton, a 1 cm del extremo inferior de la placa. La separación de los componentes se llevó a cabo con el solvente acetato de metilo/n-propanol/cloroformo/metanol/KCl al 0.25 % en agua 25:25:25:10:9 (en volumen)

(Vitiello y Zanetta, 1978 (15)).

En la separación bidimensional de los lípidos polares, la misma muestra se aplicó como un punto cerca del vértice inferior izquierdo de la placa. La primera dimensión se realizó con el solvente anterior. Luego se extrajo la placa de la cubeta, se secó con un secador de aire y se introdujo, rotada 90° respecto a la primera dimensión (en sentido contrario a las agujas de un reloj), en otra cubeta presaturada con cloroformo/metanol/acetona/ácido acético glacial/agua 75:15:30:15:7.5 (en volumen).

El contenido en plasmalógenos del ELT se analizó en una separación bidimensional realizada en las condiciones que se acaban de describir, pero la placa se sometió a la hidrólisis de los vapores de HCl tras la primera dimensión (Horrocks, 1968 (18)).

Los componentes del ELT se identificaron con lípidos patrones comerciales, y con el revelado secuencial de las placas con: exposición a vapores de yodo (para lípidos totales), nebulización con reactivo de ninhidrina (ninhidrina al 0.2% en etanol, para lípidos que contienen grupos $-NH_2$ libres) y orcinol (orcinol al 0.5% en H_2SO_4 2M, para glicolípidos). En el caso del revelado por ninhidrina, la placa se calentó en estufa a $100^\circ C$ durante 15-20 minutos después de la nebulización. Para el revelado con orcinol se calentó a $110^\circ C$ hasta que aparecieron las manchas (unos 20 minutos).

Para cuantificar las clases fosfolipídicas, cada mancha identificada, visualizada con vapores de yodo, se raspó a partir de una placa desarrollada en una sola dimensión, y su contenido en fósforo lipídico se determinó directamente. Como controles se usaron blancos conteniendo cantidades equivalentes de silicagel, libre de muestra.

La comparación entre la composición lipídica cuantitativa de ELT y mielina se llevó también a cabo por densitometría. Brevemente, un extracto de Folch de mielina y el ELT, disueltos en CM 2:1, se sembraron en una placa de

20 x 20 cm (HPTLC, gel de sílice 60, Merck), y se desarrolló monodimensionalmente, como arriba, con el solvente para lípidos polares. Finalizado el desarrollo, la placa se secó y se reveló con el reactivo de acetato de cobre (acetato de cobre al 3% (p/v) en ácido ortofosfórico al 8% (v/v), para lípidos totales). La placa revelada se fotografió. La fotografía se positivó sobre papel transparente y se sometió al análisis densitométrico utilizando un densitómetro Láser (Molecular Dynamics). La cuantificación de las áreas relativas correspondientes a cada clase lipídica se llevó a cabo con el *software* incorporado al ordenador conectado al aparato.

Cromatografía en capa fina de gangliósidos

Para identificar los gangliósidos presentes en el extracto, éstos se extrajeron previamente a partir de 2 g de ELT por el método de Tettamanti et al., 1973 (19); el dializado final se liofilizó, y los gangliósidos se separaron de fosfolípidos contaminantes mediante cromatografía en placa de HPTLC (10 x 20 cm) precubierta con gel de sílice 60 F254S, en el solvente cloroformo/metanol/agua 60:40:9, conteniendo un 0.02% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ledeen y Yu, 1978 (20)). Las manchas correspondientes a gangliósidos (positivas al reactivo de resorcinol) se separaron de los lípidos contaminantes (que se localizan en la parte superior de la placa), se rasparon y se eluyeron a partir del gel de sílice con cloroformo/metanol/agua 5:5:1. Lo eluido se evaporó a sequedad con una corriente de N_2 , se redisolvió en cloroformo/metanol 2:1 y se analizó en una placa HPTLC de 10x10 cm precubierta con gel de sílice 60 F254. Los gangliósidos se revelaron con el reactivo de resorcinol (Svennerholm, 1957 (21)), y se identificaron con gangliósidos comerciales.

Cromatografía en capa fina de lípidos neutros

Los lípidos neutros presentes en la mielina purificada y en el ELT se

identificaron mediante cromatografía sobre placas HPTLC de 10x20 cm precubiertas con silicagel 60 (sin indicador fluorescente) (Merck). En el caso de la mielina purificada, se realizó la extracción de Folch et al., 1957 (6), con CM 2:1. La fase inferior, lavada, se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno, y el residuo se redisolvió en un pequeño volumen de cloroformo/metanol 2:1 v/v. Alicuotas de estas soluciones se sembraron en las placas. En el caso del ELT, éste se disolvió directamente en CM 2:1. Se utilizó el doble desarrollo monodimensional para lípidos polares y lípidos neutros detallado en el capítulo II (ver Pág. 83). Finalizados los desarrollos, las placas se secaron con un secador de aire y se revelaron con: reactivo de acetato de cobre (lípidos totales) o reactivo de orcinol (glicolípidos). Las placas se nebulizaron intensamente con uno de estos reactivos, y se calentaron a 160 °C durante 20 minutos (acetato de cobre) o 110 °C durante 20 minutos (orcinol) en estufa.

Preparación de liposomas a partir del ELT

Los liposomas multilamelares (MLVs) se prepararon a una concentración de 20 mg de ELT por ml. Brevemente, el ELT se disolvió en cloroformo en un tubo de vidrio de 30 ml. Se evaporó el solvente con una corriente de N₂, procurando que la película lipídica se distribuyera homogéneamente por todo el fondo del tubo. Las trazas de solvente se eliminaron sometiendo el tubo a vacío (50 mT) en un liofilizador durante 30 minutos. Luego se añadió el tampón acuoso que se indica en cada caso, se saturó la atmósfera del tubo con N₂, se tapó con un tapón de rosca y agitó con un agitador de tubos tipo *vortex*, a máxima potencia durante 10-15 minutos.

Para preparar liposomas unilamelares pequeños (SUVs), la suspensión de liposomas multilamelares, en un tubo de vidrio cerrado y saturado con N₂, se sonicó hasta claridad en un sonicador de baño *Bransonic* 12 (15-20 minutos).

Los liposomas unilamelares grandes (LUVs) se prepararon a partir de los

SUVs por el método de la congelación-descongelación (Pick, 1981 (22)). La suspensión de SUVs se congeló con N₂ líquido y se dejó descongelar en baño de hielo. El proceso produce un gran aumento en la turbidez de la suspensión.

Microscopía electrónica

Tinción negativa

Para la tinción negativa, una gota de suspensión de liposomas se mezcló con un mismo volumen de solución de molibdato amónico al 2% en agua, pH 6.8 (neutralizado con NaOH). La mezcla se depositó sobre una rejilla para microscopía electrónica (300 mesh) precubierta con Formvar y sombreada con carbono. Tras 30 segundos, el exceso de líquido se retiró por capilaridad (utilizando un tubo capilar de vidrio), se dejó secar la rejilla y se observó inmediatamente al microscopio electrónico (Jeol 1200 EX II).

Criofractura

Las réplicas de criofractura de los liposomas se prepararon de acuerdo a García-Segura et al., 1986 (23). Los liposomas se fijaron en glutaraldehído al 1 %-formaldehído al 1% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, se embebieron en el mismo tampón conteniendo un 20% de glicerol durante dos horas, se cubrieron con alcohol polivinílico y se congelaron con Freon 22 enfriado con nitrógeno líquido. Las muestras se fracturaron y sombrearon con platino-carbono a -110 °C en un aparato Balzers 400D (Liechtenstein). Las réplicas de criofractura se fotografiaron en un microscopio electrónico Jeol 100 B (Japón).

Agregación de liposomas inducida por proteína básica

La proteína básica (Mr 18.5 KDa) se extrajo de sustancia blanca de cerebro bovino de acuerdo a Oshiro y Eylar, 1970 (24), y se purificó hasta la homogeneidad por RP-HPLC utilizando las condiciones descritas en el capítulo

III. Los SUVs se prepararon a partir de ELT o de DML a una concentración de 5 mg de lípido por ml en tampón NaCl 100 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4. La suspensión resultante se diluyó hasta una concentración de 1 mg de lípido/ml con el mismo tampón. Se distribuyeron alícuotas de 500 μ l en tubos Eppendorff, y se mezclaron con cantidades definidas de proteína básica disuelta en 100 μ l del mismo tampón. Se agitaron los tubos en *vortex*, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se determinó la turbidez de cada tubo midiendo su absorbancia a 450 nm.

Determinación de la permeabilidad de las membranas liposomales usando isótopos radioactivos

Determinación de la radioactividad atrapada por los liposomas

Para estudiar la salida (*leaking*) de una determinada molécula desde el interior de los liposomas hacia el espacio extraliposomal, los liposomas de ELT (LUVs o MLVs) se prepararon en un tampón acuoso conteniendo el trazador radioactivo. Se tomaron alícuotas de esta suspensión para determinar la radioactividad total (expresada en DPM/ μ l), y luego se eliminó la radioactividad no atrapada por los liposomas (radioactividad extraliposomal) filtrando la suspensión a través de jeringas rellenas con Sephadex G-25, por el método de filtración-centrifugación de Fry et al., 1978 (25). Brevemente, se empaquetan jeringas de plástico de 1 ml (de tuberculina o insulina), o de 5 ml, con Sephadex G-25, hinchado durante al menos dos horas en agua. Se equilibran con el tampón que se indica en cada caso, no radioactivo, (al menos dos veces el volumen ocupado por la resina), y se centrifugan a baja velocidad (2000 g) durante tres minutos, colgadas de tubos de plástico apropiados, en una centrífuga (Hettich Universal II) con rotor de ángulo variable (*swing-out*). Luego se carga la suspensión de liposomas sobre las jeringas (hasta 200 μ l de suspensión por cada mililitro ocupado por la resina después de la centrifugación), y se vuelve a centrifugar en

las mismas condiciones. Los liposomas eluyen prácticamente sin dilución, mientras que la radioactividad extraliposomal queda retenida en la resina. Experimentos control (filtrando tampón radioactivo, sin liposomas) mostraron que se elimina el 99.9 % de la radioactividad libre (no atrapada). La recuperación de liposomas se cifra en torno al 90% (calculada midiendo colesterol antes y después de filtrar la suspensión de liposomas a través de la resina). La radioactividad intraliposomal se determinó midiendo la radioactividad en alícuotas de 80 μ l de los liposomas filtrados, tras la adición de 3 ml de líquido de centelleo (Aquasol-2, Du Pont), en un espectrómetro β (Wallac 1410 LSC, Pharmacia) y usando un programa adecuado para cada isótopo. En los liposomas filtrados, así mismo, se determinó la concentración de colesterol en alícuotas de 10 μ l, a partir de la cual se calculó la concentración de ELT (mg ELT/ μ l) de las muestras. Con todos estos datos se calculó el **volumen encapsulado** (VE, expresado en μ l/mg de ELT), de acuerdo a la fórmula:

$$VE = \frac{\text{radioactividad intraliposomal}}{\text{radioactividad total} \times [\text{ELT}]}$$

donde las radioactividades intraliposomal y total se expresan como DPM/ μ l, y la concentración de ELT como mg ELT/ μ l.

La salida de la radioactividad encapsulada se determinó incubando los liposomas filtrados, tomando alícuotas del medio de incubación a tiempos definidos, y volviendo a determinar el volumen encapsulado, como se ha descrito, tras filtrar nuevamente a través de las jeringas rellenas con Sephadex G-25.

El método de filtración-centrifugación con minicolumnas de Sephadex G-25 se utilizó también para sustituir un tampón por otro distinto en el medio extraliposomal: liposomas preparados en un tampón determinado se filtraron a

través de columnas equilibradas con el tampón requerido en cada caso.

Para medir la entrada de una determinada molécula al interior de los liposomas, éstos se prepararon en el tampón indicado en cada caso, no radioactivo, y se incubaron en presencia del trazador radioactivo. Se tomaron alícuotas del medio de incubación (10 μ l) para determinar la radioactividad total, y a tiempos definidos se filtraron alícuotas, como se ha descrito, para determinar el volumen encapsulado.

Determinación de la permeabilidad a la sacarosa y al Rb^+ (K^+)

Se prepararon liposomas (LUVs) en tampón KCl 50 mM, NaCl 50 mM, sacarosa 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4, conteniendo [^{14}C]-sacarosa (4 μ Ci/ml) ó $^{86}Rb^+$ (8 μ Ci/ml), y la radioactividad extraliposomal se eliminó filtrándolos a través de una jeringa de 5 ml rellena con Sephadex G-25, equilibrada con el mismo tampón pero sin trazador radioactivo, como se ha descrito en el apartado anterior. Se tomaron alícuotas de los liposomas filtrados para determinar la radioactividad intraliposomal y la concentración de colesterol (volumen encapsulado a tiempo cero), y se incubaron a 37 °C. A intervalos de tiempo definidos se volvió a determinar el volumen encapsulado, tomando alícuotas de 100 μ l de la suspensión, filtrándolas a través de jeringas de 1 ml rellenas con Sephadex G-25, y determinando la radioactividad intraliposomal (en alícuotas de 80 μ l) y la concentración de colesterol (en alícuotas de 10 μ l).

El volumen encapsulado de [^{14}C -sacarosa] por los liposomas se utilizó como medida del volumen intraliposomal (VI).

Determinación de la permeabilidad a los protones

La permeabilidad de la membrana liposomal a los protones (H^+) se determinó midiendo la distribución de [^{14}C]-metilamina en el espacio intraliposomal. Esta técnica ha sido aplicada con éxito para determinar la permeabilidad a

los H^+ de la membrana de gránulos cromafines, así como de otros orgánulos subcelulares o microorganismos, tales como cloroplastos, cromatóforos, lisosomas y bacterias (Johnson y Scarpa, 1979 (26)). El método se basa en la observación de que las aminas atraviesan libremente las membranas biológicas en su forma neutra, no protonada ($R-NH_2$). En los liposomas, se alcanza el equilibrio cuando:

$$[R-NH_2]_i = [R-NH_2]_o$$

donde los subíndices i y o indican los espacios intra y extraliposomales, respectivamente. En su forma protonada, sin embargo, las aminas no son capaces de atravesar la membrana y, por tanto, tienden a acumularse en aquellos compartimentos con menor pH. Para la metilamina se cumple la siguiente fórmula:

$$[R-NH_3^+]_i/[R-NH_3^+]_o = [H^+]_i/[H^+]_o$$

Por tanto, un aumento en la concentración de metilamina intraliposomal es indicativo de una acidificación intraliposomal.

La permeabilidad a H^+ de las membranas liposomales se examinó tras la generación de un potencial de difusión de potasio (negativo dentro) inducido por la valinomicina. Brevemente, se prepararon MLVs de ELT (10 mg ELT/ml) en tampón 0.25 M sacarosa, 400 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 8.0. Este tampón se reemplazó, en el espacio extraliposomal, por el tampón 0.25 M sacarosa, 399.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 10 mM HEPES pH 8.0, por filtración-centrifugación a través de jeringas rellenas con Sephadex G-25, equilibradas con este tampón. En estas condiciones, la relación $[K^+]_i/[K^+]_o$ es de 10^3 . Tras la adición de valinomicina (ionóforo para el K^+), se creará un potencial de difusión

(negativo dentro), cuyo valor teórico viene determinado por la ecuación de Nernst:

$$\Delta\psi(\text{mV}) = -59 \times \log [K^+]_i/[K^+]_o = -177 \text{ mV}$$

Si la membrana liposomal fuera permeable a los protones, la generación de este potencial de membrana (negativo dentro) acarrearía una entrada de H^+ hacia el espacio intraliposomal, y por consiguiente, una acumulación de [^{14}C]-metilamina en este compartimento.

Alicuotas de 400 μl de la suspensión de liposomas preparados en estas condiciones se trataron con 1 μl de una solución etanólica 4 mM del protonóforo FCCP (10 μM , concentración final), o con 1 μl de etanol (tubos control), y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente en presencia de [^{14}C]-metilamina. Tras ello, se tomó de todos los tubos una alicuota de 100 μl para medir el volumen encapsulado (tiempo cero), e inmediatamente se añadió a todos los tubos valinomicina (2.6 μM , concentración final). Se tomaron alicuotas de 100 μl a los 10 y 60 minutos para medir nuevamente el volumen encapsulado. En paralelo, se realizó el mismo protocolo con MLVs con una relación $[K^+]_i/[K^+]_o = 10^2$.

Determinación de la permeabilidad al calcio

Para medir la entrada de calcio al espacio intraliposomal, se prepararon LUVs en ausencia de trazador radioactivo, y se añadió $^{45}\text{CaCl}_2$ (20 μM concentración final, 5 $\mu\text{Ci/ml}$) al medio de incubación para comenzar los experimentos. A tiempos definidos, se tomaron alicuotas y se procesaron como se ha descrito para determinar el volumen encapsulado (VE). La concentración de Ca^{2+} intraliposomal, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (μM), se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = \frac{\text{VE} \times [\text{Ca}^{2+}]_t}{\text{VI}}$$

donde $[\text{Ca}^{2+}]_t$ es la concentración total de Ca^{2+} en el medio de incubación (μM), VE es el volumen de calcio encapsulado por los liposomas ($\mu\text{l}/\text{mg}$ de ELT), y VI es el volumen intraliposomal, calculado con $[^{14}\text{C}]$ -sacarosa ($9.6 \pm 1.1 \mu\text{l}/\text{mg}$ ELT).

Determinación de la permeabilidad de las membranas liposomales usando sondas fluorescentes

El transporte de protones a través de la membrana liposomal se evaluó también mediante la extinción de la fluorescencia (*quenching*) de la 9-aminoacridina. Un entorno intravesicular que sea ácido con respecto al medio extravesicular causa la captación de esta base débil fluorescente, permeable a la membrana, y su acumulación en el compartimento intravesicular, lo cuál provoca una gran elevación local de su concentración y la extinción de su fluorescencia. En un experimento típico, se impuso un gradiente de pH (ácido dentro) de 1.89 unidades añadiendo 30 μl de LUVs preparados en tampón HEPES 10 mM, MES 10 mM, cloruro de colina 12 mM, pH 5.51 sobre 2 ml de tampón HEPES 10 mM, MES 10 mM, KCl ó NaCl 12 mM, pH 7.40, conteniendo la 9-aminoacridina (6 μM , concentración final), en una cubeta de 3 ml del espectrofluorímetro Shimadzu RF-5001PC, con agitación magnética y termostatización a 25 °C. La evolución temporal de la fluorescencia de la 9-aminoacridina se midió a una longitud de onda de excitación de 420 nm (5 nm de rendija), y una longitud de onda de emisión de 520 nm (5 nm de rendija), utilizando el programa *Labtime* en el ordenador personal conectado al aparato. Los resultados se expresan con el tanto por ciento de fluorescencia, otorgando el 100% a la fluorescencia previa a la adición de los liposomas.

RESULTADOS

Optimización de las condiciones para la extracción lipídica

La Figura 45 muestra la capacidad de diferentes volúmenes de solvente (desde 20 hasta 300 ml de THF por gramo de tejido, peso seco) para extraer los lípidos de la sustancia blanca fresca (Figura 45A) o liofilizada (Figura 45B), en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Parece evidente que el agua proporcionada al medio por el tejido fresco es de gran importancia. Cuando se utiliza sustancia blanca fresca como material de partida, son necesarios mayores volúmenes de THF para la máxima recuperación de lípidos y mínima contaminación proteica. En contraste, cuando el material de partida está liofilizado, únicamente se necesitan 50 ml de THF por gramo de tejido para obtener resultados comparables. El tejido liofilizado permite la utilización de volúmenes más pequeños pero, si se prefiere, puede extraerse tejido fresco a condición de que se usen mayores volúmenes de solvente (al menos 150 ml de THF por gramo de tejido, peso seco). El rendimiento máximo de ELT, en ambos casos, es cercano al 50%. Ello significa que, fijando las condiciones de extracción en 50 ml de THF por gramo de sustancia blanca liofilizada, se pueden obtener 15 g de ELT liofilizado a partir de 30 g de tejido seco, con una contaminación proteica despreciable (0.10%). Estas condiciones fueron las elegidas en la preparación del ELT, cuya composición cualitativa y cuantitativa se describe a continuación.

Análisis cualitativo de los lípidos polares del ELT

El patrón en la composición de lípidos polares del ELT por HPTLC mono y bidimensional se muestra en la Figuras 46B y 46A, respectivamente. Contiene todas las clases fosfolipídicas y glicolipídicas encontradas en mielina: cerebrósidos (dos manchas principales), sulfátidos (dos manchas), fosfoglicéridos de etanolamina (PE), inositol (PI), serina (PS) y colina (PC), así como colesterol

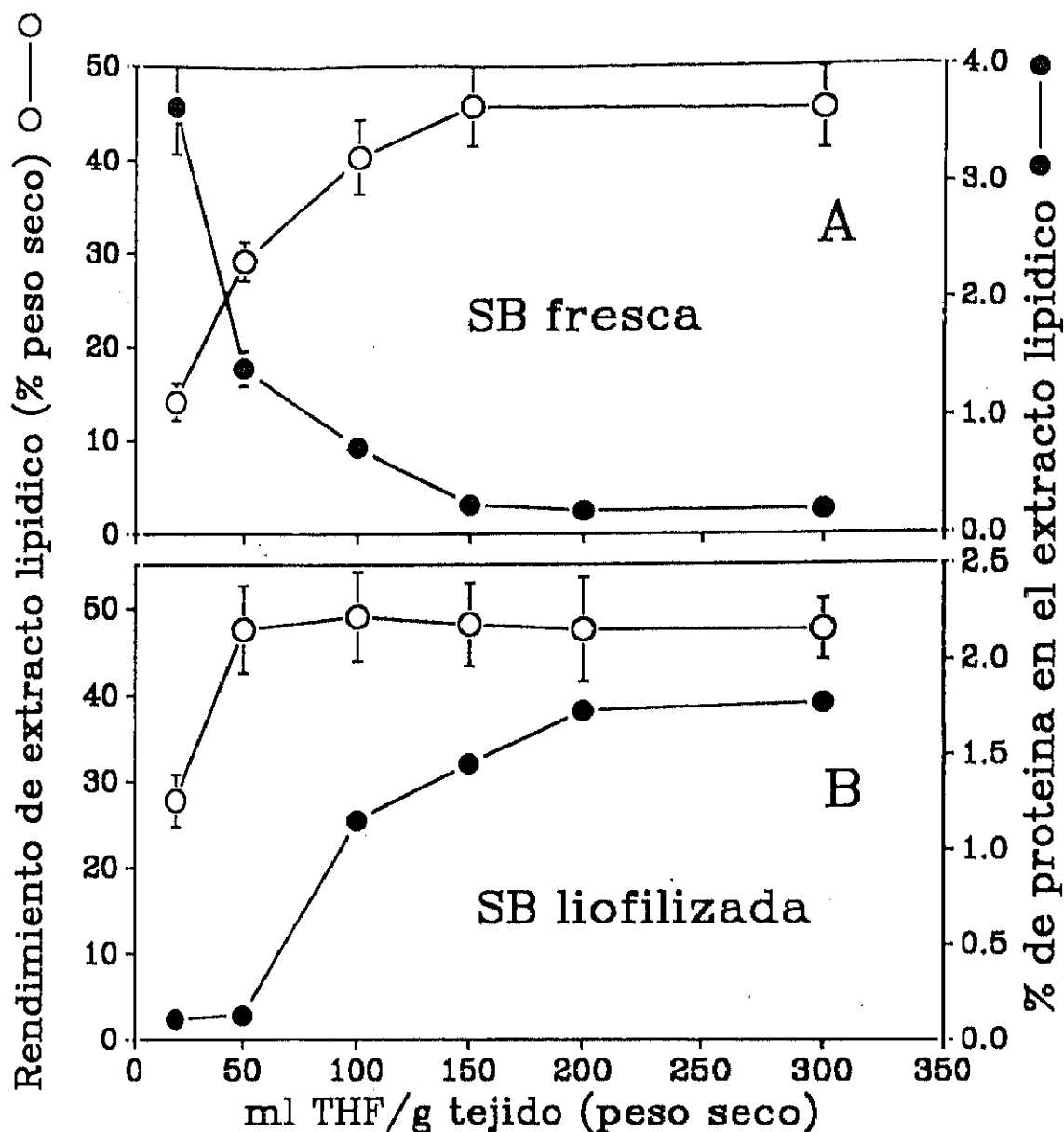


Figura 45.- Curvas de extracción y contenido en proteína de los lípidos extraídos por el THF. La sustancia blanca fresca (A) o liofilizada (B), conteniendo una misma cantidad de tejido seco, se trataron con distintos volúmenes de THF, durante una hora y a temperatura ambiente. Tras filtrar, cada extracto se liofilizó y se pesó, y se determinó su contenido en proteína. Los resultados son el promedio de tres experimentos distintos. Las barras verticales muestran la desviación estándar.

(Chol), ácido fosfatídico (PA) y esfingomielina (Sph). Las manchas más intensas, utilizando como revelador los vapores de I_2 , corresponden a PE y al cerebrósido no hidroxilado. Los cerebrósidos con ácido graso alfa-hidroxilado, pese a su abundancia, tiñen poco con este reactivo debido a la ausencia de insaturaciones en el ácido graso unido. Similarmente, el colesterol tampoco tiñe intensamente con vapores de I_2 , porque se encuentra en su forma libre, no esterificada. En contraste, ambos lípidos producen las manchas más intensas cuando las placas se revelan con el reactivo de acetato de cobre (Figura 47).

En la Figura 46C se muestra el alto contenido en plasmalógenos, principalmente en los fosfoglicéridos de etanolamina, característico de los lípidos de mielina. Representan la mayor parte de los fosfoglicéridos de etanolamina totales.

Es importante hacer notar que los principales gangliósidos presentes en la sustancia blanca también se detectan en el ELT (Figura 46D). Las moléculas más abundantes son: GD_{1a} y GM_1 , aunque GT_{1b} , GD_{1b} y GM_3 también se observan claramente. El doblete que migra entre GD_{1a} y GM_1 debe corresponderse con GD_3 (Ledeen y Yu, 1978 (20)). La banda difusa que migra por encima de GM_3 podría corresponder al GM_4 , el gangliósido específico de mielina.

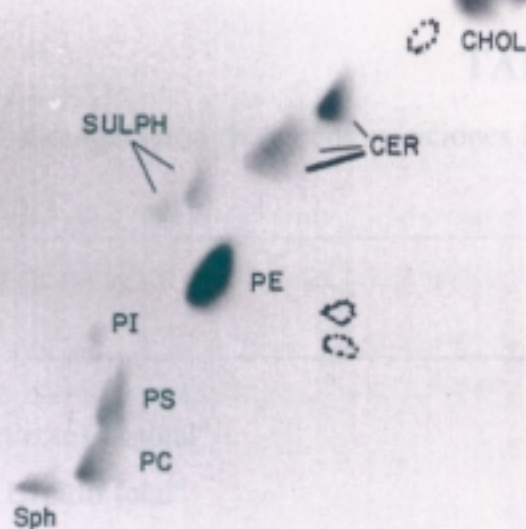
Análisis cuantitativo de los lípidos del ELT

La composición del ELT obtenido a partir de sustancia blanca liofilizada se compara con la composición de la mielina del SNC bovino, descrita por Norton, 1981 (27), en la Tabla 8. Mientras que el 25% del peso seco total de la mielina es proteína, sólo se detectan trazas (0.10%) en el ELT. Por otra parte, la determinación analítica en un extracto final, lavado, de sustancia blanca por el método de Folch et al., 1957 (6) reveló un contenido de proteína del 13% del peso seco total del extracto. Esto significa que el extracto de Folch tiene un contenido en proteína al menos 130 veces mayor que el del ELT obtenido

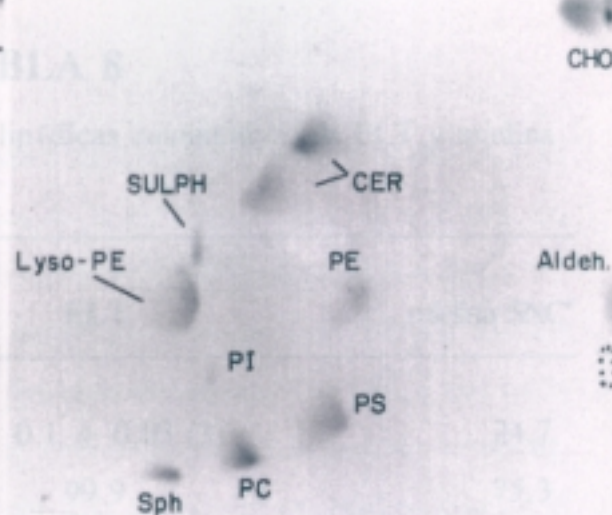
Figura 46.- Composición cualitativa del ELT por cromatografía en capa fina. A y B, separaciones bidimensional y monodimensional de lípidos polares, respectivamente, sobre placas de HPTLC. En A, la muestra (85 natom de P total), disuelta en CM 2:1, se aplicó como un punto en el ángulo inferior izquierdo de la placa. En B, las dos muestras de ELT (170 y 255 natom de P, izquierda y derecha, respectivamente) se aplicaron formando una banda de 0.8 cm. En C se muestra el contenido en plasmalógenos del ELT, en una separación bidimensional (57 natom de P). Tras desarrollar la primera dimensión, la placa se expuso a vapores de HCl, y luego se desarrolló la segunda dimensión. D, análisis de los gangliósidos contenidos en el ELT: WM, gangliósidos purificados a partir del ELT; 5 μ g de NANA (izquierda) y 10 μ g de NANA (derecha). ST, mezcla de gangliósidos comerciales (18.4 μ g de NANA). Los reactivos reveladores fueron: vapores de yodo (A-C) y reactivo de resorcinol (D).

Abreviaturas: CHOL, colesterol; CER, cerebrósidos; SULPH, sulfátidos; PE, fosfoglicéridos de etanolamina; PA, ácido fosfatídico; PI, fosfoglicéridos de inositol; PS, fosfoglicéridos de serina; PC, fosfoglicéridos de colina; Sph, esfingomielina; Aldeh., aldehídos derivados de la hidrólisis de los plasmalógenos; Lyso-PE, plasmalógeno de PE hidrolizado.

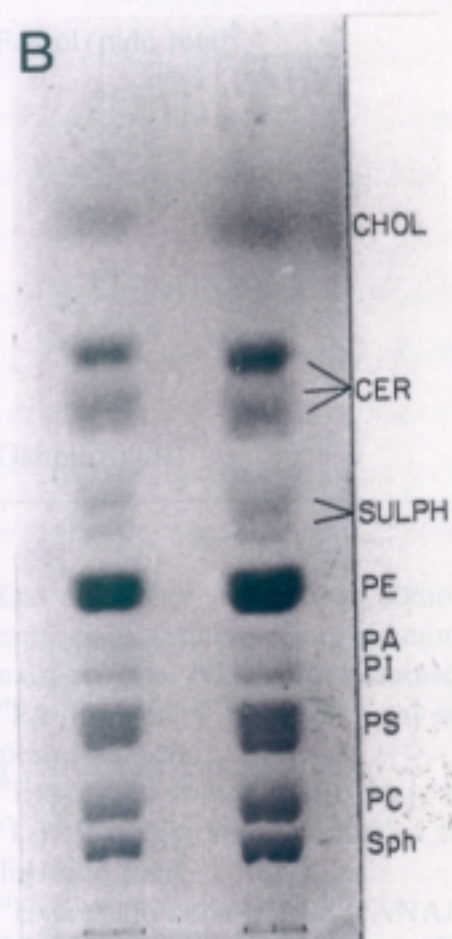
A



C



B



D

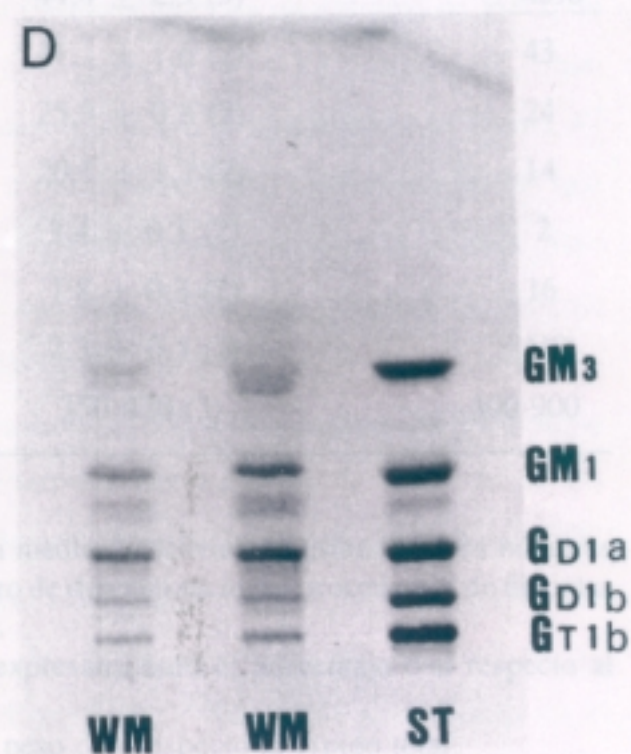


TABLA 8

Comparación de las composiciones lipídicas cuantitativas de ELT y mielina

	ELT	mielina SNC ^e
Proteína total ^a	0.1 ± 0.03 (3)	24.7
Lípido total ^a	99.9	75.3
Colesterol ^b	23.3 ± 1.6 (4)	28.1
Galactolípido total ^b	30.3 ± 2.4 (3)	29.3
Fosfolípido total ^b	44.4 ± 2.3 (5)	43.0
PE ^c	41.1 ± 1.6 (2)	43
PC ^c	25.3 ± 0.8 (2)	24
PS ^c	20.1 ± 1.7 (2)	14
PI ^c	3.4 ± 0.1 (2)	2
Sph ^c	7.8 ± 0.3 (2)	16
PA ^c	2.3 ± 0.5 (2)	ND
Gangliósidos ^d	350-420 (3)	300-900

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar. Los números entre paréntesis se refieren al número de determinaciones procedentes de distintas extracciones. ND, no determinado.

^aLa proteína y el lípido total se expresan como el porcentaje con respecto al peso seco total.

^bExpresado como el porcentaje en peso con respecto al lípido total.

^cLos fosfolípidos individuales se expresan como moles/100 moles del fósforo lipídico total.

^dExpresado como µg de NANA/g, peso seco.

^eValores tomados de Norton, 1981 (27).

Abreviaturas: PE, PC, PS y PI, fosfoglicéridos de etanolamina, colina, serina e inositol, respectivamente. Sph, esfingomielina. PA, ácido fosfatídico.

con THF.

Desde el punto de vista cuantitativo, la composición lipídica del ELT es muy parecida a la composición lipídica de la membrana miélinica (Tabla 8), aunque aquél contiene un poco menos colesterol (23.3 %) que la mielina (28.1 %). Respecto a las cantidades relativas de cada clase fosfolipídica, parece que los fosfolípidos acídicos, como PS y PI, son más abundantes en el ELT que en la mielina, mientras que PE y PC están en proporciones prácticamente idénticas. Así mismo, la esfingomielina parece ser más abundante en mielina que en el ELT.

La semejanza fue aún mayor, sin embargo, cuando se compararon directamente, por densitometría, las composiciones de un extracto de Folch de mielina purificada (Figura 47, trazo de la izquierda) y del ELT (Figura 47, trazo de la derecha). Aunque los datos cuantitativos que se muestran en la Figura 47 no pueden ser tenidos en cuenta en términos absolutos, a diferencia de los que aparecen en la Tabla 8, sí permiten comparar la riqueza relativa de cada clase lipídica en ambos extractos. Parece que el ELT tiene una cantidad ligeramente superior de glicolípidos totales (sulfátidos y cerebrósidos), a expensas de una proporción ligeramente inferior de colesterol, PE y PC, aunque las diferencias quizás no lleguen a ser significativas. Cualitativamente, la única diferencia aparente entre los dos extractos es la presencia de una banda tenue en el ELT, inmediatamente por encima del origen, correspondiente a un monosialogangliósido (GM), probablemente el GM₃, de mayor movilidad que el resto de los gangliósidos presentes en el ELT (Figura 46D), los cuáles permanecen en el origen con el solvente que se ha utilizado en este caso.

Caracterización de los lípidos neutros del ELT

La Figura 48 muestra la composición de lípidos polares y neutros presentes en un extracto de Folch de mielina purificada y en el ELT, utilizando

Figura 47.- Análisis cuantitativo de las clases lipídicas presentes en mielina purificada (**MIEL**) y en el ELT (**ELT**) por densitometría. Un extracto de Folch de mielina purificada y una solución de ELT en CM 2:1 se sembraron en banda sobre una placa de HPTLC (170 natom de P total en los dos casos). La placa se desarrolló con el solvente para lípidos polares, se reveló con el reactivo de acetato de cobre y se analizó por densitometría. Los trazos que se muestran a ambos lados de la placa corresponden al perfil densitométrico de cada muestra. Los números se refieren al porcentaje que representa el área de cada pico con respecto al área total.

Abreviaturas: Cer-OH y Sulf-OH, cerebrósidos o sulfátidos con ácido graso hidroxilado; GM, monosialogangliósido; OR, origen. Las otras abreviaturas son equivalentes a las que se indican en la Figura 46.

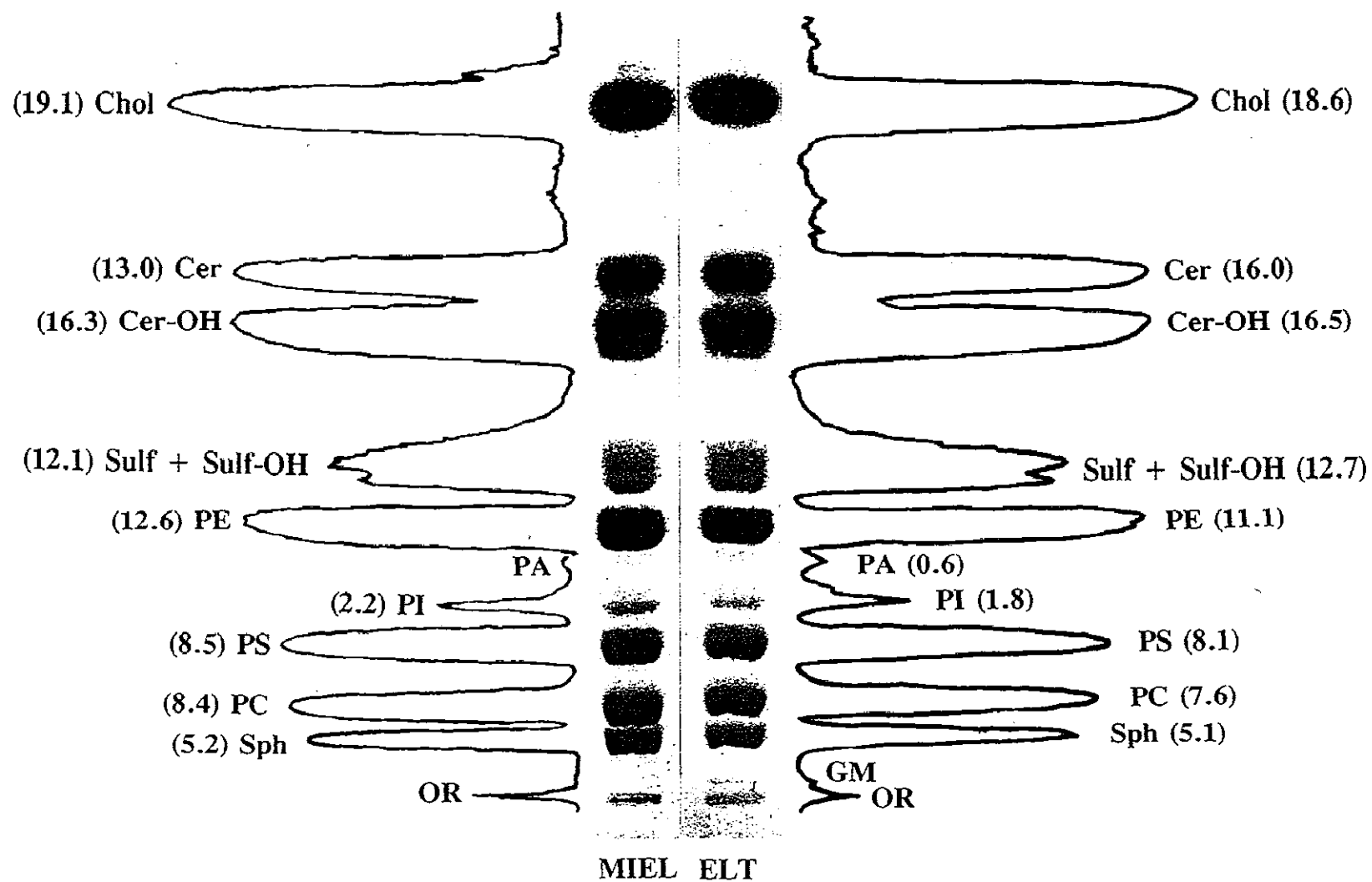
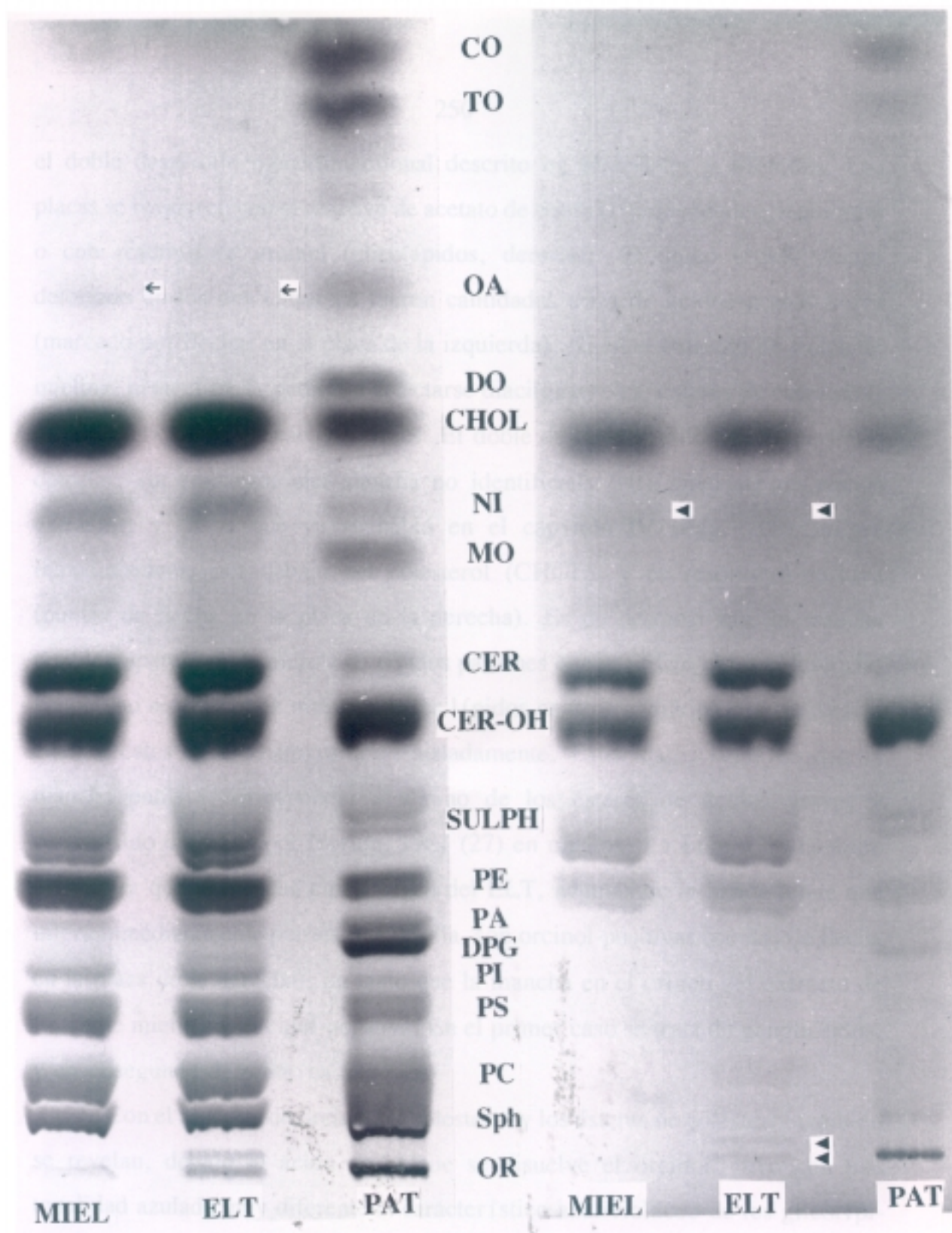


Figura 48.- Contenido en lípidos neutros de la mielina purificada (MIEL) y el ELT (ELT). Un extracto de Folch de mielina, o el ELT disuelto en CM 2:1 (170 natom de P en los dos casos) se analizaron con el doble desarrollo monodimensional para lípidos polares y lípidos neutros sobre una placa de HPTLC, 10 x 20 cm. La placa de la izquierda se reveló con reactivo de acetato de cobre (lípidos totales). La placa de la derecha se reveló con reactivo de orcinol (glicolípidos). PAT, mezcla de lípidos patrones comerciales.

Abreviaturas: CO, oleato de colesterilo; TO, trioleína; OA, ácido oleico; DO, dioleína; MO, monooleína; NI, no identificado; DPG, cardiolipina. Las otras abreviaturas son equivalentes a las de las Figuras 46 y 47.



el doble desarrollo monodimensional descrito en Materiales y Métodos. Las placas se revelaron con el reactivo de acetato de cobre (lípidos totales, izquierda) o con reactivo de orcinol (glicolípidos, derecha). El único lípido neutro detectado en los dos extractos fueron cantidades traza de ácidos grasos libres (marcado por flechas en la placa de la izquierda). Ni en el extracto de Folch de mielina, ni en el ELT, pudieron detectarse diacilglicerol, ésteres de colesterol, monoacilglicerol o triacilglicerol. El doble desarrollo utilizado sí permitió detectar, sin embargo, una mancha no identificada (NI), presente en ambos extractos, y de la que ya se habló en el capítulo IV (Pág. 200). Migra inmediatamente por debajo del colesterol (CHOL), y es resorcinol-positiva (puntas de flecha en la placa de la derecha). Es de destacar que la mancha también aparece en la mezcla de lípidos patrones que se utilizó como referencia, aunque no se detectó en ninguno de los lípidos neutros incluidos en esta mezcla cuando éstos se cromatografiaron aisladamente. Estos datos sugieren que la mancha pudiera corresponder a alguno de los ésteres de ácidos grasos y cerebrósido descritos por Norton, 1981 (27) en mielina. La Figura 48 también demuestra que la mancha en el origen del ELT, además de la banda tenue que migra inmediatamente por encima de ella, son orcinol-positivas (puntas de flecha en la placa de la derecha), en tanto que la mancha en el origen del extracto de Folch de mielina es orcinol-negativa. En el primer caso se trata de gangliósidos, y en el segundo de proteína.

Con el reactivo de orcinol, el colesterol y los ésteres de colesterol también se revelan, debido al ácido en el que se disuelve el orcinol, pero con una tonalidad azulada muy diferente al característico azul-violáceo de los glicolípidos. Otros lípidos presentes en alta proporción, como la PE, tiñen ligeramente, pero con un color marrón oscuro, debido a su carbonización por el ácido del reactivo y el calentamiento en estufa.

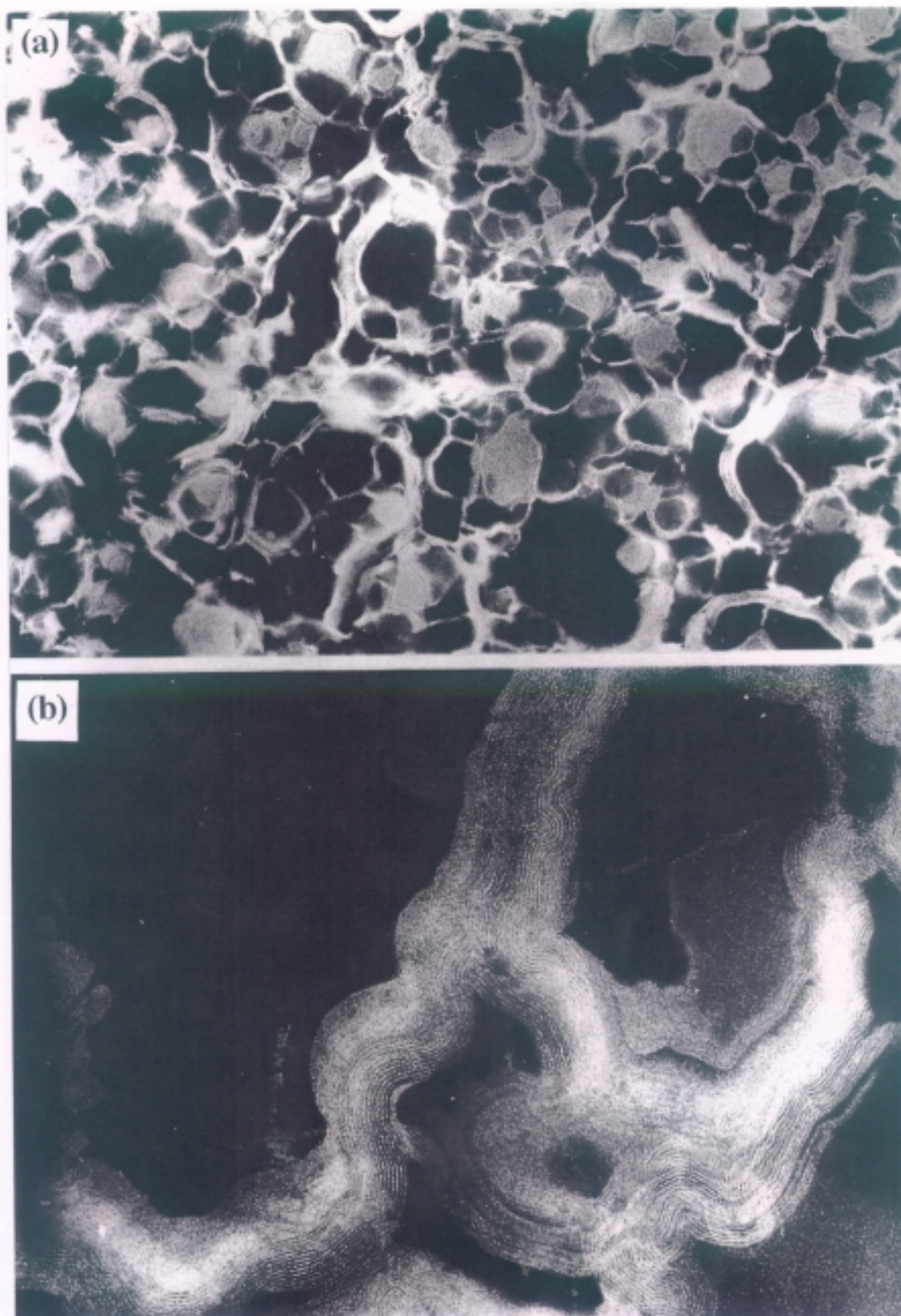
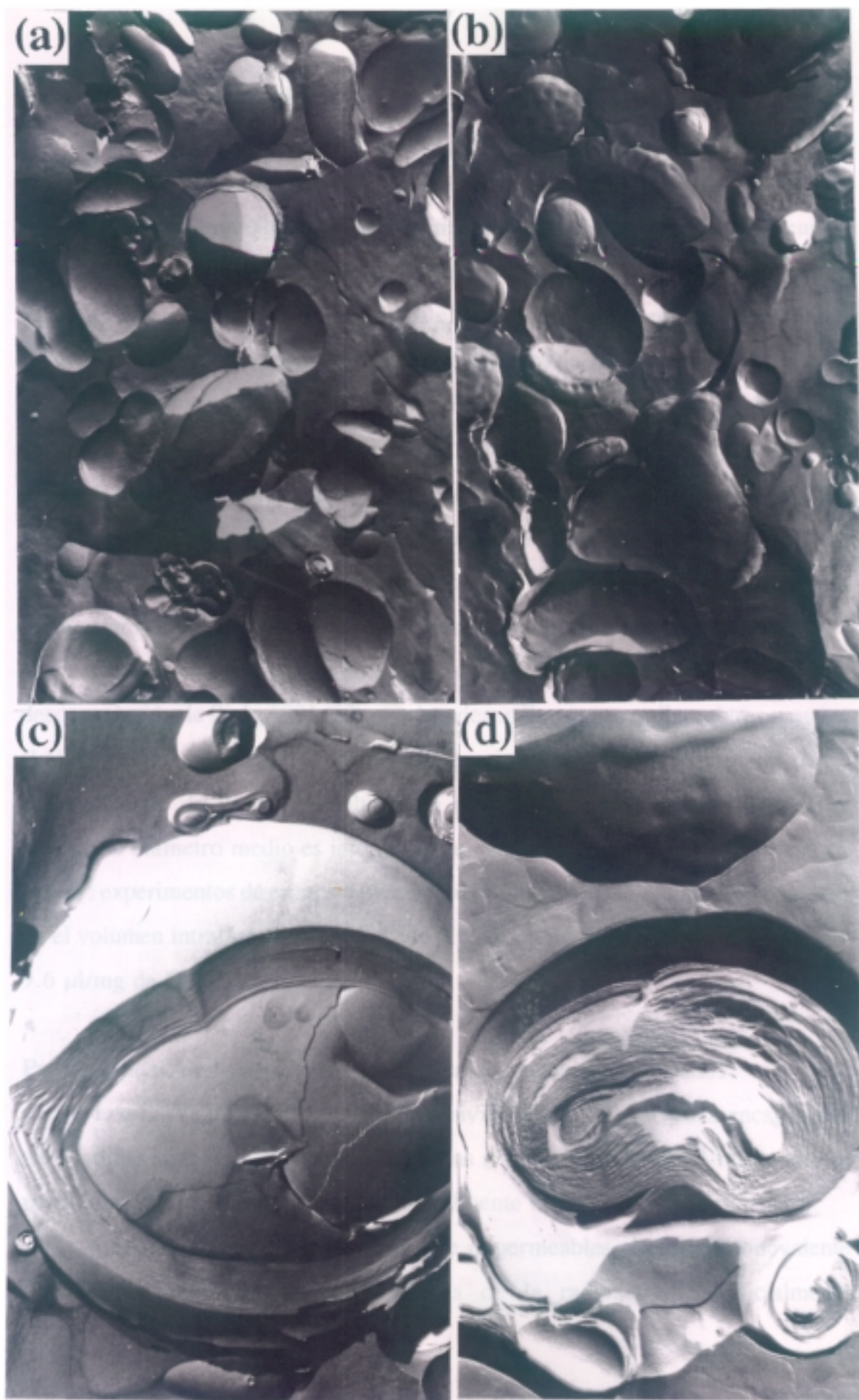


Figura 49.- Liposomas multilamelares (MLVs) de ELT visualizados al microscopio electrónico mediante la técnica de tinción negativa con molibdato amónico. (a) x6000; (b) x30000.

Figura 50.- Réplicas de criofractura de liposomas unilamelares grandes (LUVs, **a-b**) y liposomas multilamelares (MLVs, **c-d**) preparados con ELT, como se describe en Materiales y Métodos. (a), x15000; (b), x15000; (c), x12000; (d), x30000.



Caracterización morfológica de los liposomas preparados con ELT

Los lípidos que constituyen el ELT se reorganizan espontáneamente al ser suspendidos en tampón acuoso formando liposomas multilamelares (MLVs) de estructura típica, como los mostrados al microscopio electrónico por las técnicas de tinción negativa (Figura 49) o criofractura (Figura 50, c-d). Estos son muy variables en tamaño, aunque muchos de ellos son visibles al microscopio óptico (no mostrado), algunos pudiendo alcanzar diámetros de varias decenas de micras. Al someter la suspensión de MLVs a la sonicación procedente de un sonicador de baño, la alta turbidez inicial se transforma, en 15-20 minutos, en sólo una ligera opalescencia, incluso cuando se utilizan concentraciones de lípido tan altas como 40 mg ELT/ml. La microscopía electrónica (tinción negativa, no mostrado) reveló que esta suspensión sonicada está compuesta por liposomas unilamelares pequeños (SUVs), con diámetro medio inferior a los 50 nm.

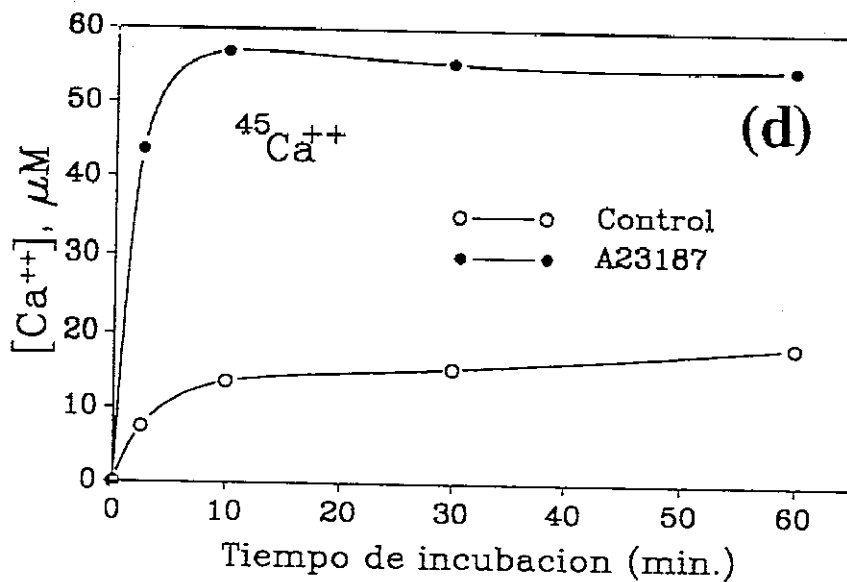
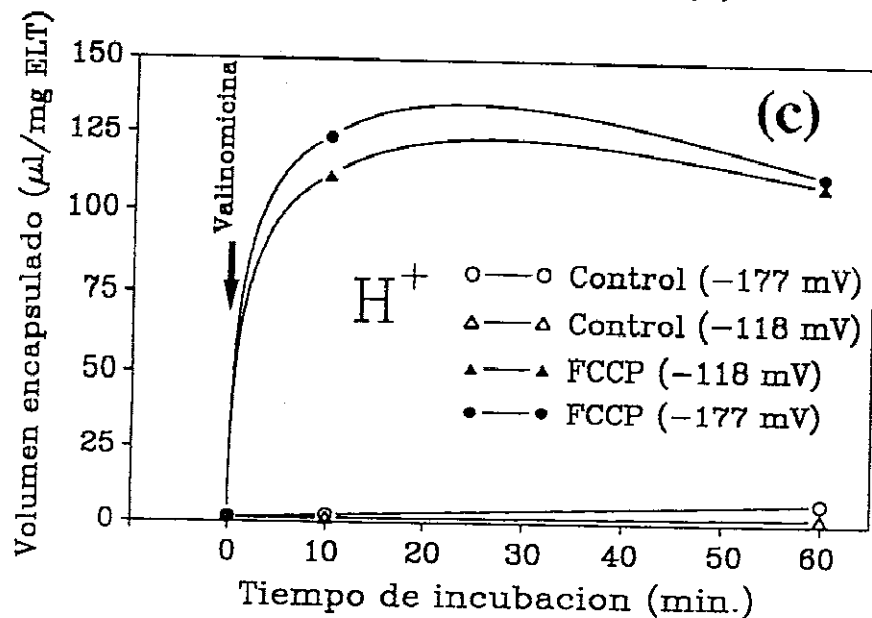
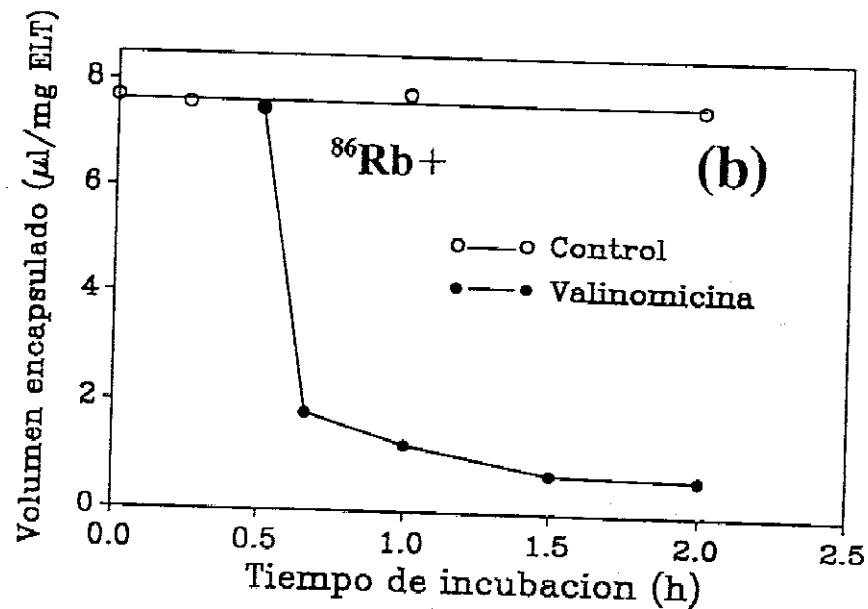
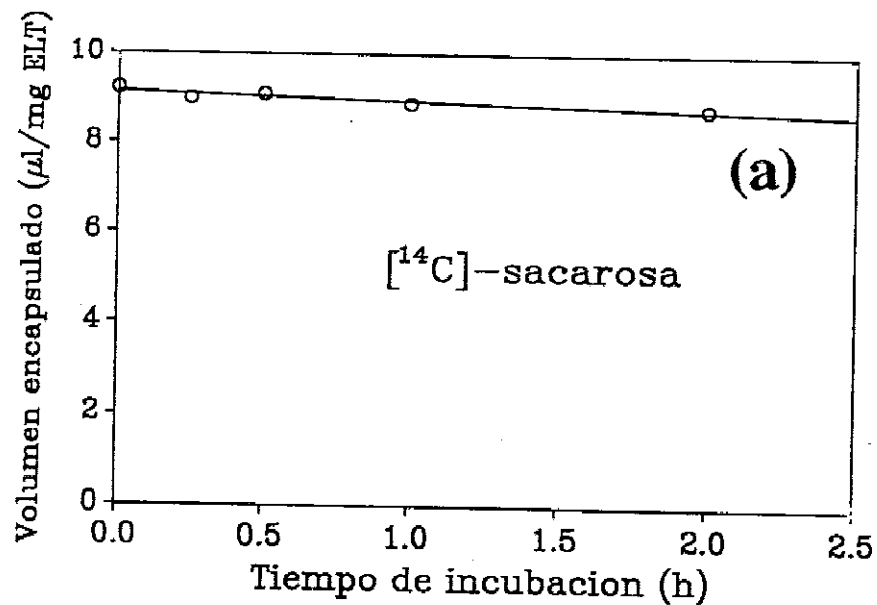
Cuando una suspensión de SUVs se sometió al proceso de congelación-descongelación de Pick, 1981 (22), se obtuvieron liposomas unilamelares grandes (LUVs), como muestran las imágenes de criofractura en la Figura 50 (a-b). Estos, aunque de tamaño variable, son más homogéneos que los MLVs, y aunque su diámetro medio es inferior al de éstos, su volumen intraliposomal es mayor: experimentos de encapsulamiento de [^{14}C]-sacarosa revelaron un aumento en el volumen intraliposomal (VI) desde 6.6 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de ELT para los MLVs hasta 9.6 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de ELT para los LUVs.

Permeabilidad de la membrana de liposomas preparados con ELT

Los LUVs preparados con ELT retuvieron la [^{14}C]-sacarosa encapsulada sin pérdidas significativas durante dos horas (Figura 51a). Tras 24 horas sólo se perdió un 20% de la radioactividad inicialmente encapsulada (no mostrado).

Los LUVs fueron también bastante impermeables al catión monovalente $^{86}\text{Rb}^+$: no hubo pérdidas significativas de la radioactividad inicialmente

Figura 51.- Permeabilidad de las membranas de los liposomas preparados con ELT. En a y b se prepararon LUVs (20 mg ELT/ml) en el tampón KCl 50 mM, NaCl 50 mM, sacarosa 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4, conteniendo [^{14}C]-sacarosa (4 $\mu\text{Ci/ml}$, a) o $^{86}\text{RbCl}$ (8 $\mu\text{Ci/ml}$, b). La radioactividad extraliposomal se eliminó por filtración-centrifugación a través de minicolumnas de 5 ml rellenas con Sephadex G-25, equilibradas con el mismo tampón pero sin trazador radioactivo. Inmediatamente se tomó una alícuota de los liposomas filtrados para cuantificar la radioactividad intraliposomal y la concentración de colesterol (tiempo cero), a partir de las cuáles se determinó el volumen encapsulado. Se incubaron a 37°C , y a los intervalos de tiempo indicados se tomaron nuevas alícuotas de 100 μl , se volvieron a filtrar, y se volvió a determinar el volumen encapsulado. En b, la permeabilidad al Rb^+ (K^+) también se estudió tras la adición de valinomicina (8.5 nM, concentración final) al medio de incubación. La permeabilidad a los H^+ (c) se estudió en MLVs (10 mg ELT/ml) equilibrados con [^{14}C]-metilamina (1 $\mu\text{Ci/ml}$), tras la generación de potenciales de difusión de potasio, inducidos por la valinomicina (2.6 μM), con valores teóricos de -118 mV ó -177 mV (negativo dentro), en presencia o ausencia del protonóforo FCCP (10 μM). El aumento en el encapsulamiento de [^{14}C]-metilamina indica una acidificación del compartimento intraliposomal (ver **Materiales y Métodos**). La permeabilidad al Ca^{++} (d) se determinó en LUVs (20 mg de ELT/ml) preparados en tampón KCl 50 mM, NaCl 50 mM, sacarosa 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4, e incubados a 37°C . El ensayo se inició tras la adición de $^{45}\text{CaCl}_2$ (20 μM , 5 $\mu\text{Ci/ml}$) al medio de incubación. Inmediatamente (tiempo cero), y a los intervalos de tiempo indicados, se tomaron alícuotas de 100 μl del medio de incubación, se filtraron a través de minicolumnas de Sephadex G-25, y se determinó la radioactividad intraliposomal y la concentración de colesterol. Un experimento equivalente se llevó a cabo en presencia del ionóforo de Ca^{++} A23187.

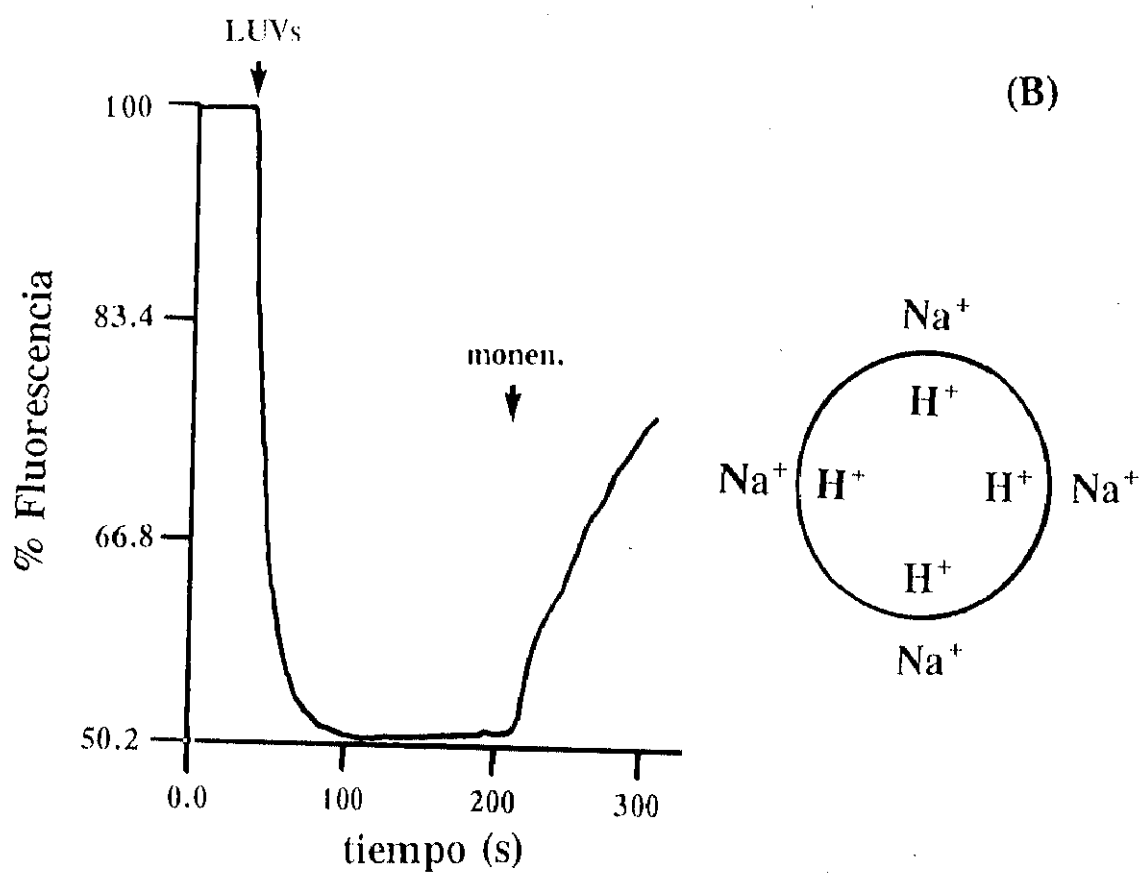
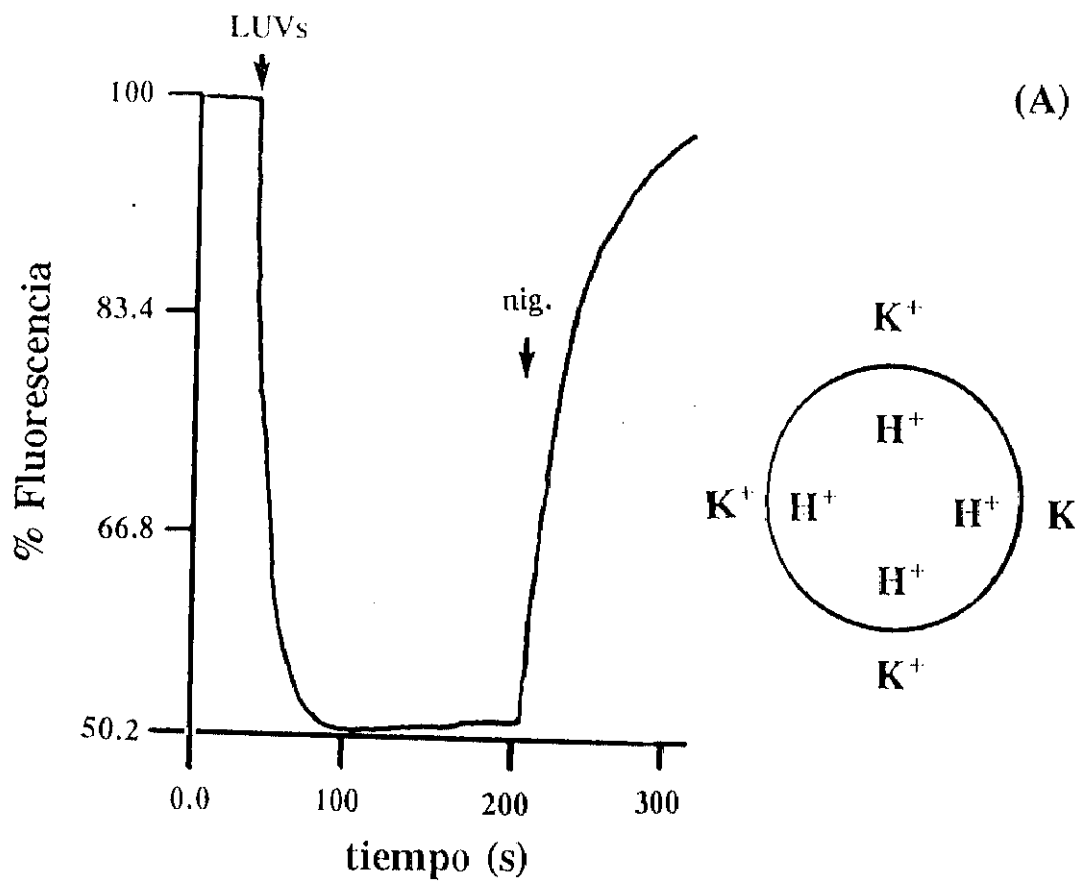


encapsulada durante 2 horas de incubación (Figura 51b). Tras 24 horas de incubación sólo se perdió un 21% de la radioactividad inicialmente encapsulada (no mostrado). Sin embargo, cuando en el medio de incubación de los liposomas se incluyó valinomicina, ionóforo específico para K^+ (Rb^+) (Figura 51b, símbolos negros), se perdió un 77% de la radioactividad inicialmente encapsulada en tan sólo 10 minutos, y un 90% en una hora.

Como se deduce de la Figura 51d, los LUVs fueron más permeables al calcio. De hecho, 10 minutos después de la adición de $^{45}CaCl_2$ al medio de incubación ya se observó un incremento sustancial en la radioactividad intraliposomal, que se mantuvo durante al menos 80 minutos (Figura 51d, símbolos blancos). El ionóforo de calcio A23187 aumentó muy significativamente el influjo de calcio hacia el interior del liposoma, alcanzando un equilibrio aparente tras 10 minutos de incubación.

Las membranas de los liposomas preparados con ELT fueron, así mismo, bastante impermeables a los protones (Figura 51c), incluso tras la generación de potenciales teóricos de membrana tan altos como -177 mV (negativo dentro). Cuando el mismo potencial de membrana se aplica a los mismos liposomas, pero tratados con el protonóforo FCCP, se observa un aumento abrupto del encapsulamiento de $[^{14}C]$ -metilamina, indicativo de un gran aumento en la permeabilidad a los H^+ . Unos resultados similares pueden deducirse al aplicar una técnica distinta, la medida de la fluorescencia de la 9-aminoacridina, tras la imposición de un gradiente de pH (ácido dentro) a través de la membrana de los liposomas (Figura 52), en presencia de K^+ ó Na^+ en el espacio extravesicular. La adición de LUVs preparados en tampón con pH 5.51 sobre el medio extraliposomal (pH 7.40), que contiene la 9-aminoacridina además de KCl ó NaCl, induce una extinción rápida de la fluorescencia hasta el 50% de su valor inicial, tras lo cual se obtiene una línea de base estable. Cuando los LUVs se prepararon en el mismo tampón utilizado como medio extraliposomal ($pH_i = pH_o = 7.40$) la

Figura 52.- Permeabilidad a H^+ de LUVs preparados con ELT, tras la imposición de un gradiente de pH de 1.89 unidades a través de la membrana, medida por espectrofluorimetría. Treinta microlitros de LUVs preparados en tampón 10 mM HEPES, 10 mM MES, 12 mM cloruro de colina, pH 5.51 (40 mg de ELT/ml) se añadieron, en una cubeta de 3 ml termostatizada a 25 °C y con agitación magnética constante, sobre 2 ml de tampón 10 mM HEPES, 10 mM MES, pH 7.4, conteniendo la sonda fluorescente (9-aminoacridina, 6 μ M concentración final) y KCl 12 mM (A) ó NaCl 12 mM (B). El establecimiento del gradiente de pH (ácido dentro) provoca la acumulación de la 9-aminoacridina en el compartimento intraliposomal, y la extinción de su fluorescencia hasta el 50% de su valor inicial. Tras ello, la línea de base se mantiene estable, lo cual indica que no hay disipación espontánea del gradiente preestablecido y, por tanto, no hay salida neta de H^+ desde el interior de los liposomas hacia el espacio extraliposomal. Este gradiente se disipa rápidamente, sin embargo, tras la adición de nigericina (1 μ M, concentración final) en presencia de K^+ (A), o tras la adición de monensina (1 μ M, concentración final) en presencia de Na^+ (B)



extinción de la fluorescencia fue despreciable (inferior al 5 % de su valor inicial). Ello indica que el gradiente de pH inicialmente impuesto (1.89 unidades) se mantiene estable y, por tanto, puede deducirse que no hay salida neta de protones desde el interior de los liposomas hacia el espacio extraliposomal, bien por un mecanismo de permeabilidad pasiva a través de la bicapa, o bien a través de un intercambio K^+/H^+ ó Na^+/H^+ . Sin embargo, cuando al medio se añade nigericina (un intercambiador K^+/H^+ , Figura 52A) o monensina (intercambiador Na^+/H^+ , Figura 52B), tiene lugar una rápida disipación del gradiente de pH por el intercambio de los H^+ con el K^+ (Figura 52A) ó Na^+ (Figura 52B) del compartimento extraliposomal, lo cual se traduce en un incremento rápido en la fluorescencia de la 9-aminoacridina.

Interacción de la proteína básica de mielina con liposomas de ELT

La Figura 53 señala una aplicación de los liposomas preparados con el ELT al estudio de las interacciones lípido-proteína que ocurren en el interior de la vaina de mielina. Se sabe que la proteína básica de mielina es capaz de interaccionar con los lípidos acídicos y de inducir la agregación *in vitro* de vesículas preparadas con lípidos que contienen algún fosfolípido negativo (Wood y Moscarello, 1989 (28)). En la Figura 53 se muestra cómo los liposomas unilamelares pequeños (SUVs) preparados con ELT agregan al interactuar con la proteína básica purificada, de una manera típicamente cooperativa, dando lugar a gráficas de tipo sigmoideal. En contraste, los SUVs preparados a partir de un fosfolípido neutro sintético, la dimiristoil lecitina (DML), no sufren agregación, incluso cuando se añaden grandes cantidades de proteína básica al medio de incubación.

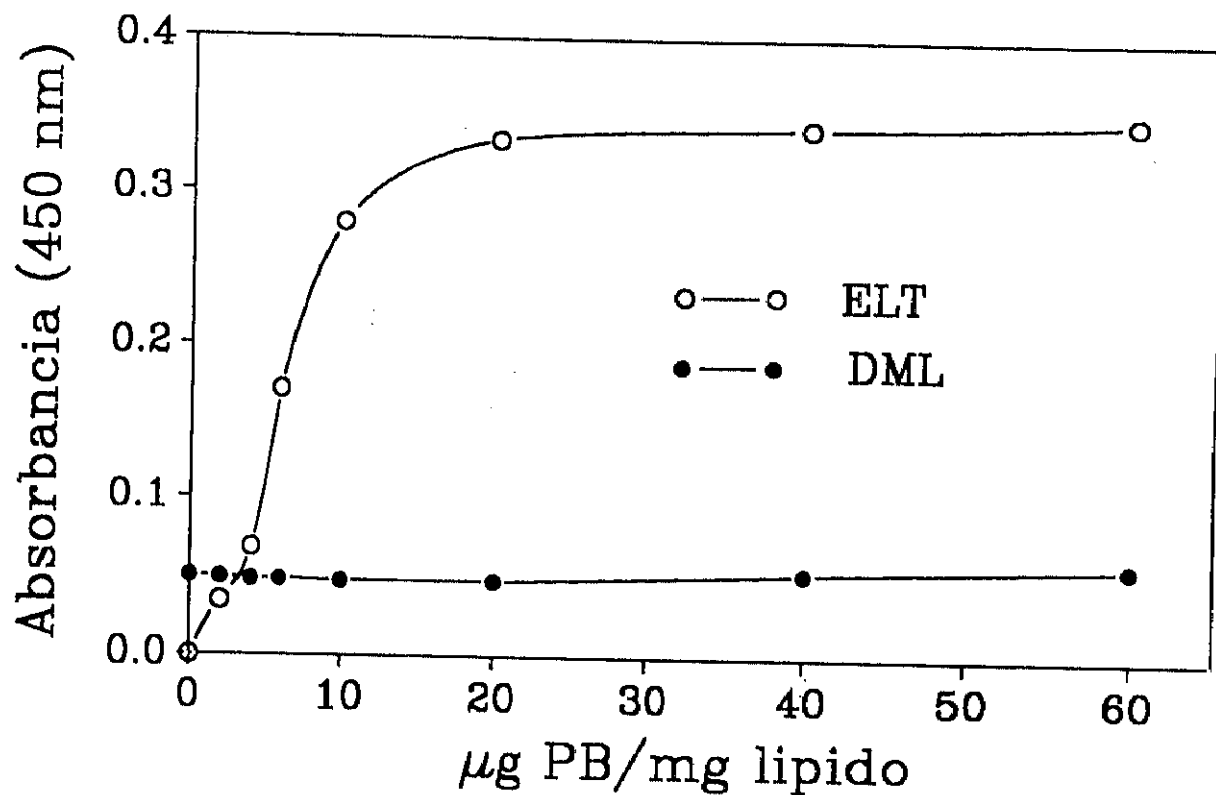


Figura 53.- Interacciones lípido-proteína básica. Se prepararon liposomas unilamelares pequeños (SUVs) a partir del ELT o de un fosfolípido neutro sintético, la dimirisoil lecitina (DML), a una concentración de 1 mg de lípido/ml, en tampón NaCl 100 mM, 10 mM HEPES, pH 7.4. Aliquotas de 500 µl de cada suspensión se incubaron durante 30 minutos, a temperatura ambiente, con distintas cantidades de proteína básica purificada (PB), disuelta en 100 µl del mismo tampón. La turbidez de las suspensiones se cuantificó midiendo su absorbancia a 450 nm.

DISCUSION

El objetivo principal de los experimentos recogidos en este capítulo fue el obtener un extracto lipídico que, conservando la composición lipídica natural de la membrana mielínica, no estuviera contaminado por proteínas, principalmente proteolípídicas, que frecuentemente coextraen con los lípidos en los solventes orgánicos corrientemente utilizados (Folch et al., 1957 (6)), y que podrían interferir con experimentos de reconstitución diseñados para determinar el papel funcional de las proteínas que forman parte de la membrana mielínica. En los liposomas preparados con un extracto lipídico de estas características, la función y las interacciones lípido-proteína de las proteínas de mielina pueden ser ensayadas más convenientemente que en otros entornos lipídicos, pues es bien sabido que los lípidos nativos juegan un papel tan importante como las proteínas en el mantenimiento de las características estructurales y funcionales de las biomembranas. Al mismo tiempo, estos liposomas serían un modelo ideal para estudiar las propiedades de permeabilidad de la matriz lipídica de la membrana mielínica, sin ninguna interferencia debida a las proteínas.

Se escogió el THF como solvente porque, siendo tan buen disolvente de lípidos como el CM 2:1 v/v (Autilio y Norton, 1963 (7)), no coextrae cantidades significativas de proteína cuando las condiciones de extracción se ajustan convenientemente (Figura 45). Otros solventes que han sido empleados para extraer lípidos a partir de tejido cerebral, tales como el hexano/isopropanol 3:2 v/v (Xie et al., 1984 (29); Khursed y Shoeman, 1990 (30)), extraen poca proteína pero, en cambio, el rendimiento del extracto lipídico es inferior y algunos componentes lipídicos (p. ej. glicolípidos, gangliósidos) se recuperan sólo parcialmente (Christie, 1989 (31)). Otros solventes clásicos empleados para delipidar tejidos cerebrales extraen casi exclusivamente o preferencialmente colesterol (p. ej. acetona).

Es posible extraer el tejido cerebral con cloroformo/metanol 2:1 y luego

intentar separar la proteína del lípido. Ello requiere, sin embargo, el fraccionamiento cromatográfico a través de resinas organofílicas (Sephadex LH-60 ó LH-20), que alargan considerablemente la duración del procedimiento. Alternativamente, también se puede precipitar la proteína coextraída con los lípidos con otro solvente, por ejemplo acetona o éter/etanol 1:1 v/v. En este caso, una cantidad sustancial de lípido, especialmente glicolípidos y fosfolípidos, coprecipitan con los proteolípidos (resultados no mostrados), con el consiguiente cambio en la composición cuali y cuantitativa del extracto lipídico purificado.

La aplicación del THF a la extracción de los lípidos totales de la sustancia blanca de cerebro requiere, sin embargo, minimizar la concentración de agua en el medio. Ello se consigue mediante el uso de tejido liofilizado como material de partida o, en caso de utilizar tejido fresco, usando volúmenes grandes de solvente (Figura 45). La razón reside en el hecho de que las mezclas de THF y agua en varias proporciones extraen proteína a partir de sustancia blanca (ver capítulo III, Figura 11, Pág. 120).

La aplicación de este mismo método a la extracción de lípidos de mielina purificada como material de partida resultó en una mayor contaminación proteica de los extractos, razón por la cuál se utilizó rutinariamente sustancia blanca. La eliminación de las sales del tejido durante el proceso de aislamiento de la membrana parece ser responsable, en parte, del aumento en la extracción de proteína (Lees y Brostoff, 1984 (32)). El hecho de que el ELT, a pesar de extraerse de sustancia blanca y no de mielina, tenga una composición cuali y cuantitativa prácticamente indistinguible de la composición lipídica de la membrana mielínica purificada (ver Figuras 47 y 48), indica que la utilización del tejido liofilizado es igualmente satisfactoria, con las ventajas adicionales de una inferior contaminación proteica y el evitar el proceso de aislamiento de la membrana, muy laborioso y costoso.

El ELT obtenido con THF difiere del obtenido por el método de Folch et

al., 1957 (6) no sólo en el contenido en proteína, sino también en la composición lipídica cualitativa, ya que la etapa de lavado del extracto con soluciones acuosas en el método clásico de Folch elimina los lípidos más polares del extracto. Ello se traduce en que la fase orgánica lavada, que contiene todos los fosfolípidos, no contiene gangliósidos. Como se muestra en la Figura 46D y en la Tabla 8, el ELT obtenido con THF contiene todos los gangliósidos presentes en mielina o sustancia blanca. El THF ha sido utilizado para extraer gangliósidos a partir de tejido cerebral (Tettamanti et al., 1973 (19)), así que estos resultados podían esperarse. Recientemente se ha demostrado la participación de estos glicoesfingolípidos en la regulación de algunas funciones de mielina, como la fosforilación de la proteína básica, hecho que podría ser de gran importancia en la modulación de la estabilidad de la vaina de mielina (Chan, 1989 (33)). Se ha descrito, así mismo, una estrecha interacción entre los gangliósidos y la proteína básica (Chan et al., 1990 (34)), que podría intervenir en el anclaje de la proteína básica a la membrana mielínica. Además, los gangliósidos pueden modificar la permeabilidad de vesículas fosfolipídicas (Sarti et al., 1990 (35)).

Aunque con algunas diferencias, la proporción de las clases lipídicas encontradas en el ELT son muy similares a las de mielina (Tabla 8 y Figuras 47 y 48), si bien parece que el primero es ligeramente menos rico en colesterol y más rico en glicolípidos totales.

El ELT, al ser suspendido en un tampón acuoso con ayuda de un *vortex*, se vesiculiza espontáneamente dando lugar a liposomas multilamelares (MLVs, Figura 49 y Figura 50,c-d). Este hecho, aunque previsible, es significativo, porque el mismo proceso, aplicado a una mezcla lipídica que contiene cerebrósidos, sulfátidos, PC, PE, PS y esfingomielina, pero no colesterol, mezclados en las mismas proporciones encontradas en mielina, conduce a la formación espontánea de vesículas unilamelares grandes y pequeñas (LUVs y SUVs, respectivamente) (Fraser et al., 1986 (36)). Ello da idea de la importancia

que puede ejercer la presencia o ausencia de un determinado lípido, no sólo en el funcionamiento normal de muchas proteínas de membrana, sino en las propias interacciones lípido-lípido y en la reorganización de las bicapas.

Además, los liposomas preparados con ELT son apropiados para realizar experimentos de transporte iónico. Son bastante estables, porque no se encontró pérdidas significativas de la [^{14}C]-sacarosa encapsulada durante un período de dos horas (Figura 51a), y sólo un 20% de la radioactividad total originalmente encapsulada se perdió tras 24 horas de incubación. Son, además, bastante impermeables a los cationes monovalentes, como se muestra en la Figura 51b para el K^+ (Rb^+). De hecho, los iones inorgánicos pequeños no atraviesan fácilmente las membranas modelo fosfolipídicas (Sedgwick y Bragg, 1990 (37)). Sin embargo, los liposomas de ELT responden rápidamente cuando el ionóforo específico de K^+ (Rb^+), la valinomicina, se añade al medio de incubación. Entonces tiene lugar una rápida salida de la radioactividad encapsulada hacia el medio extraliposomal.

Los liposomas preparados con ELT también son bastante impermeables a los H^+ . Ello se deduce de la aplicación de dos técnicas diferentes, utilizando distintos protocolos: a) no hay aumento significativo del encapsulamiento de [^{14}C]-metilamina tras la generación de potenciales de difusión de potasio, inducidos por valinomicina, tan altos como -177 mV (negativo dentro), salvo que los liposomas se tratan con el ionóforo específico para H^+ , el FCCP (Figura 51C); b) cuando se impone una gradiente de pH de 1.89 unidades (ácido dentro) a través de la membrana liposomal, no se observa ninguna disipación de este gradiente, a juzgar por la estabilidad en la línea de base después de la extinción inicial de la fluorescencia de la 9-aminoacridina. Sin embargo, tal disipación sucede al añadir nigericina (en presencia de K^+ extraliposomal, Figura 52A) o monensina (en presencia de Na^+ extraliposomal, Figura 52B) al medio.

El hecho de que la membrana de los liposomas preparados con los

lípidos de mielina sean muy poco permeables a los H^+ contrasta con los resultados encontrados en liposomas preparados con otros lípidos, tales como los extractos lipídicos de algunas membranas de bacterias como *Bacillus alcalophilus*, *B. firmus* o *Escherichia coli* (García et al., 1984 (38)), o incluso fosfolípidos sintéticos (L-alfa-dioleilfosfatidilcolina; Norris y Powell, 1990 (39)) o extractos lipídicos vegetales (asolectina; Cooper et al., 1990 (40)). En estos liposomas se ha descrito no sólo una permeabilidad pasiva a H^+ , inducida por la generación de potenciales de difusión de K^+ mediada por valinomicina (García et al., 1984 (38)), sino también un intercambio electroneutro K^+/H^+ (Cooper et al., 1990 (40)). Entre los factores que pueden contribuir al aumento de la permeabilidad a los H^+ de un determinado extracto lipídico destacan: a) la presencia de proteolípidos, que coextraen habitualmente con los lípidos en las mezclas de cloroformo y metanol, muchos de los cuáles, incluido el de mielina, pueden actuar como protonóforos (Lin y Lees, 1982 (41)); b) la presencia de cantidades apreciables de ácidos grasos libres en el extracto lipídico, que pueden actuar como intercambiadores transmembrana de H^+ y otros cationes inorgánicos (Wrigglesworth et al., 1990 (42)). Como se aprecia en la Tabla 8 y en la Figura 48, el ELT contiene sólo cantidades traza de ambos componentes. Es previsible, sin embargo, que un aumento en la cantidad de ácidos grasos libres, tal como ocurre en algunas patologías del sistema nervioso central, como la esclerosis múltiple (Wilson y Tocher, 1991 (43)) pudiera aumentar la permeabilidad a los H^+ de la membrana mielínica, aunque las consecuencias de ello sobre el normal funcionamiento de la vaina no han sido todavía establecidas. Un mecanismo adicional, que puede inducir un aumento en la permeabilidad a protones a través de la membrana de los liposomas, es la presencia de iones bicarbonato en las soluciones, procedente del CO_2 atmosférico, y que parecen actuar como acarreadores transmembrana de protones (Norris y Powell, 1990 (39)). Sin embargo, la abundancia de lípidos acídicos en el ELT, que otorgan

una carga neta negativa a la superficie de los liposomas que se han utilizado en este capítulo, podría ser determinante al disminuir el movimiento de este anión a través de la membrana, como se ha sugerido para el caso de la membrana interna mitocondrial (Norris y Powell, 1990 (39)).

En contraposición a lo comentado anteriormente, los liposomas preparados con ELT son bastante más permeables al calcio (Figura 51D), incluso en la ausencia de ionóforo de calcio (A23187). Se sabe que los fosfolípidos negativos, presentes en el ELT, tales como PA, PI o PS, promueven el tránsito de iones Ca^{2+} en vesículas fosfolipídicas (Tyson et al., 1976 (44); Blau y Weissmann, 1988 (45)).

Se piensa que la proteína básica o sus isómeros de carga desempeñan papeles funcionales definidos en el mantenimiento de la estructura de mielina. Un modelo simple *in vitro* para probar la manera en que esta proteína participa en las interacciones lípido-proteína es medir la agregación de liposomas que contienen lípidos negativos tras la adición de la proteína purificada. En general se utilizan para ello liposomas de fosfatidilcolina (PC) que contiene algún lípido negativo (principalmente PS) (Wood y Moscarello, 1989 (28)). En este sistema, la proteína básica induce la agregación de las vesículas de una manera cooperativa. La Figura 53 muestra la agregación de SUVs preparadas a partir de ELT. Estos liposomas contienen todos los lípidos, incluyendo gangliósidos, presentes en la mielina del cerebro, por lo que deben ajustarse mejor a las interacciones lípido-proteína que tienen lugar en la membrana nativa.

La gran similitud en la composición lipídica de ELT y mielina sugiere que los resultados presentados en este capítulo son representativos de las propiedades que tiene la matriz lipídica de la membrana mielínica nativa.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Brown III F.R., Karthigasan J., Singh I. y Kirschner D.A. (1989). *X-ray diffraction analysis of myelin lipid/proteolipid protein multilayers*. **J. Neurosci. Res.** 24:192-200.
- 2.- Cózar M., Lucas M. y Monreal (1987). *Ionophoric properties of the proteolipid apoprotein from bovine brain myelin*. **Biochem. Int.** 14:833-841.
- 3.- Jones O.T., Eubanks J.H., Earnest J.P. y McNamee M.G. (1988). *A minimum number of lipids are required to support the functional properties of the nicotinic acetylcholine receptor*. **Biochemistry** 27:3733-3742.
- 4.- McCormick J.I. y Johnstone R.M. (1988). *Volume enlargement and recovery of Na⁺-dependent amino acid transport in proteoliposomes derived from Ehrlich ascites cell membranes*. **J. Biol. Cell** 263:8111-8119.
- 5.- Chakrabarti A.K., Dasgupta S., Banik N.L. y Hogan E.L. (1990). *Regulation of the calcium activated neutral proteinase (CANP) of bovine brain by myelin lipids*. **Biochim. Biophys. Acta** 1038:195-198.
- 6.- Folch J., Lees M. y Sloane-Stanley G.H. (1957). *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. **J. Biol. Chem.** 226:497-509.
- 7.- Autilio L.A. y Norton W.T. (1963). *Non-aqueous solvent extracts of lyophilized bovine brain white matter*. **J. Neurochem.** 10:733-738.
- 8.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. **J. Biol. Chem.** 193:265-275.
- 9.- Aguilar J.S., de Cózar M., Criado M. y Monreal J. (1982). *Method for lyophilizing brain proteolipid preparations that increases subsequent solubilization by detergents*. **J. Neurochem.** 39:1733-1736.
- 10.- Norton W.T. y Autilio L.A. (1966). *The lipid composition of purified bovine brain myelin*. **J. Neurochem.** 13:213-222.
- 11.- Ames B.N. and Dubin D.T. (1960). *The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid*. **J. Biol. Chem.** 235:769-775.

- 12.- Siedel J., Schlumberger H., Klose S., Ziegenhorn J. y Wahlefeld A.W. (1981). *Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol*. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** 19:838-839.
- 13.- Trevelyan W.E. y Harrison J.S. (1952). *Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates*. **Biochem. J.** 50:298-303.
- 14.- Kishimoto Y. (1978). *Preparation and determination of cerebroside*. En (Marks N. y Rodnight R., eds.): **Research Methods in Neurochemistry**, vol. 4. Nueva York, Plenum Press. Pp: 411-436.
- 15.- Vitiello F. y Zanetta J.P. (1978). *Thin-layer chromatography of phospholipids*. **J. Chromatogr.** 166:637-640.
- 16.- Warren L. (1959). *The thiobarbituric acid assay of sialic acids*. **J. Biol. Chem.** 234:1971-1975.
- 17.- Chaplin M.F. (1986). *Monosaccharides*. En (Chaplin M.F. y Kennedy J.F., eds): **Carbohydrates analysis -A practical approach**. Oxford, IRL Press. Pp:1-36
- 18.- Horrocks L.A. (1968). *The alk-1-enyl group content of mammalian myelin phosphoglycerides by quantitative two-dimensional thin-layer chromatography*. **J. Lipid Res.** 9:469-472.
- 19.- Tettamanti G., Bonali F., Marchesini S. y Zambotti V. (1973). *A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides*. **Biochim. Biophys. Acta** 296:160-170.
- 20.- Ledeen R.W. y Yu R.K. (1978). *Methods for isolation and analysis of gangliosides*. En (Marks N. y Rodnight R., eds.): **Research Methods in Neurochemistry**, vol. 4. Nueva York, Plenum Press. Pp: 371-410.
- 21.- Svennerholm L. (1957). *Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method*. **Biochim. Biophys. Acta** 24:604-611.
- 22.- Pick U. (1981). *Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures*. **Arch. Biochem. Biophys.** 212:186-194.
- 23.- García-Segura L.M., de Cózar M., Moreno M.C. y Monreal J. (1986). *Freeze-fracture characterization of proteolipid protein and basic protein*

of central nervous system myelin incorporated in liposomes. Brain Res. 380:261-266.

- 24.- Oshiro Y. y Eylar E.H. (1970). *Allergic encephalomyelitis: preparation of the encephalitogenic basic protein from bovine brain. Arch. Biochem. Biophys.* 138:392-396
- 25.- Fry D.W., White J.C. y Goldman I.D. (1978). *Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. Anal. Biochem.* 90:809-815.
- 26.- Johnson R.G. y Scarpa A. (1979). *Protonmotive force and catecholamine transport in isolated chromaffin granules. J. Biol. Chem.* 254:3750-3760.
- 27.- Norton W.T. (1981). *Biochemistry of myelin.* En (Waxman S.G. y Ritchie J.M., eds.): **Demyelinating disease: Basic and clinical electrophysiology.** Nueva York, Raven Press. Pp: 93-121.
- 28.- Wood D.D. y Moscarello M.A. (1989). *The isolation, characterization, and lipid-aggregating properties of a citrulline containing myelin basic protein. J. Biol. Chem.* 264:5121-5127.
- 29.- Xie X.-S., Stone D.K. y Racker E. (1984). *Activation and partial purification of the ATPase of clathrin-coated vesicles and reconstitution of the proton pump. J. Biol. Chem.* 259:11676-11678.
- 30.- Kurshed A.A., Shoeman D.W. (1990). *Arachidonic and docosahexanoic acid content of bovine brain myelin: Implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. Neurochem. Res.* 15:7-11.
- 31.- Christie W.W. (1989). *Fatty acids and lipids: structures, extraction and fractionation into classes.* En (Christie W.W., ed.): **Gas chromatography and lipids. A practical guide.** The Oily Press, Glasgow. Pp: 10-42.
- 32.- Lees M.B. y Brostoff S.W. (1984). *Proteins of myelin.* En (Morell P., ed.): **Myelin, 2nd Edition.** Nueva York, Plenum Press. Pp: 197-224.
- 33.- Chan K.-F.J. (1989). *Phosphorylation of myelin basic protein and peptides by ganglioside-stimulated protein kinase. Biochem. Biophys. Res. Com.* 165:93-100.
- 34.- Chan K.-F.J., Robb N.D. y Chen W.H. (1990). *Myelin basic protein: Interaction with calmodulin and gangliosides. J. Neurosci. Res.* 25:535-544.

- 35.- Sarti P., Antonini G., Malatesta F., Vallone B., Brunori M., Masserini M., Palestini P. y Tettamanti G. (1990). *Effect of gangliosides on membrane permeability studied by enzymic and fluorescence-spectroscopy techniques*. **Biochem. J.** 267:413-416.
- 36.- Fraser P.E., Moscarello M.A., Rand R.P. y Deber Ch.M. (1986). *Spontaneous vesicularization of myelin lipids is counteracted by myelin basic protein*. **Biochim. Biophys. Acta** 863:282-288.
- 37.- Sedgwick E.G. y Bragg P.D. (1990). *Differential movement of ions in artificial phospholipid vesicles*. **FEBS Lett.** 272:81-84.
- 38.- García M.L., Kitada M., Eisenstein H.C. y Krulwich T.A. (1984). *Voltage-dependent proton fluxes in liposomes*. **Biochim. Biophys. Acta** 766:109-115.
- 39.- Norris F.A. y Powell G.L. (1990). *The apparent permeability coefficient for proton flux through phosphatidylcholine vesicles is dependent on the direction of flux*. **Biochim. Biophys. Acta** 1030:165-171.
- 40.- Cooper Ch.E., Wrigglesworth J.M. y Nicholls P. (1990). *The mechanism of potassium movement across the liposomal membrane*. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 173:1008-1012.
- 41.- Lin L.-F.H. y Lees M.B. (1982). *Interactions of dicyclohexylcarbodiimide with myelin proteolipid*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:941-945.
- 42.- Wrigglesworth J.M., Cooper Ch.E., Sharpe M.A. y Nicholls P. (1990). *The proteoliposomal steady state. Effect of size, capacitance and membrane permeability on cytochrome-oxidase-induced ion gradients*. **Biochem. J.** 270:109-118.
- 43.- Wilson R. y Tocher D.R. (1991). *Lipid and fatty acid composition is altered in plaque tissue from multiple sclerosis brain compared with normal brain white matter*. **Lipids** 26:9-15.
- 44.- Tyson C.A., Zande H.V. y Green D.E. (1976). *Phospholipids as ionophores*. **J. Biol. Chem.** 251:1326-1332.
- 45.- Blau L. y Weissmann G. (1988). *Transmembrane calcium movements mediated by ionomycin and phosphatidate in liposomes with Fura 2 entrapped*. **Biochemistry** 27:5661-5666.

CAPITULO VI

RECONSTITUCION DE LOS PROTEOLIPIDOS
EN LIPOSOMAS DE ELT
EFECTOS SOBRE LA PERMEABILIDAD
AL ION Ca^{2+}

INTRODUCCION

Conseguida la purificación de los proteolípidos a partir de la membrana mielínica purificada, y la obtención de un extracto lipídico total (ELT), libre de proteína, con una composición prácticamente idéntica a la composición lipídica de la membrana nativa, se llevaron a cabo experimentos de reconstitución para determinar, por una parte, la estructura secundaria que adopta la proteína purificada en un entorno lipídico semejante al nativo, y por otro, la manera en que la proteína es capaz de modificar las propiedades de permeabilidad de la matriz lipídica, cuyas características se describieron en el capítulo anterior. Dado que en trabajos previos ya se estudió la modificación de la permeabilidad de membranas artificiales, inducida por PLP, a iones monovalentes (Na^+ , K^+ , H^+) (Ting-Beall et al., 1979 (1); Lin y Lees, 1982 (2); Helynek et al., 1982 (3); Cózar et al., 1987 (4)), en el presente capítulo se hizo especial referencia al ión Ca^{2+} . Este ión juega un papel primordial en la estabilización de la estructura de la vaina de mielina, en la cuál se acumula en las líneas intraperiódicas (Ropte et al., 1990 (5)). Además, otros proteolípidos no mielínicos participan directamente en el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana, o ejercen su función en respuesta a flujos de Ca^{2+} (Knowles et al., 1980 (6); Morel et al., 1991 (7)).

En general, todos los estudios de transporte iónico llevados a cabo con el PLP en sistemas modelo de membrana han utilizado lípidos de composición muy diferente a la de la membrana mielínica, especialmente fosfolípidos sintéticos, lecitina de yema de huevo y extractos lipídicos de soja (asolectina). Dado que la actividad de muchas proteínas intrínsecas de membrana es dependiente de lípidos específicos, y que algunos lípidos son esenciales para los mecanismos de translocación iónica (Tyson et al., 1976 (8); Blau y Weissmann, 1988 (9)), la utilización de un entorno lipídico semejante al nativo para la reconstitución

de los proteolípidos, *a priori*, debe adecuarse mejor a los propósitos que se persiguen en este capítulo. De hecho, resultados espectroscópicos han mostrado que los recombinantes preparados con la apoproteína proteolipídica (PLA) y un extracto lipídico de cerebro mimetizan mejor las condiciones naturales de la membrana mielínica que las mezclas de PLA y lípidos sintéticos (Nedelec et al., 1989 (10)).

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Los cerebros de vaca se obtuvieron del matadero municipal de Madrid, y se transportaron al laboratorio en baño de hielo. El $^{45}\text{CaCl}_2$ y la $[^{14}\text{C}]$ -sacarosa fueron suministrados por Amersham (Reino Unido). El kit para la determinación enzimática de colesterol, el ionóforo A23187 y el ATP fueron de Boehringer Mannheim (Alemania). El tetrahidrofurano (THF), el Triton X-100 y el Sephadex G-25 fueron de Probus (España), BDH (Reino Unido) y Pharmacia (Suecia), respectivamente. El EGTA, el HEPES, el 5-adenililimidodifosfato (AMP-PNP), el β , β -metilenadenosina 5'-trifosfato (AMP-PCP), el ADP, el AMP y el GTP fueron de Sigma (EEUU).

Preparación del extracto lipídico total (ELT)

El ELT se extrajo a partir de la sustancia blanca de cerebro bovino liofilizada con THF (50 ml de THF/g de sustancia blanca liofilizada) como se describe en el capítulo V.

Purificación de la apoproteína proteolipídica (PLA)

Los apoproteolípidos se purificaron por RP-HPLC a partir de la membrana mielínica purificada, utilizando la columna Altex RPSC Ultrapore C-3 semipreparativa, como se describe en el capítulo III. Brevemente, la membrana liofilizada se delipidó seis veces con THF (8 ml de THF por cada 50 mg de membrana liofilizada) y se disolvió en THF/agua 4:1 v/v, 0.1% TFA (6 mg de proteína total/ml). Antes de la inyección en la columna, la solución se diluyó con TFA al 0.1% en agua hasta una concentración final de THF en la solución del 30% (2.25 mg de proteína total/ml). Rutinariamente, se inyectaron 6 mg de proteína total por cada inyección, utilizando un *loop* de 4.8 ml. Las fracciones correspondientes a los proteolípidos se juntaron, y se precipitaron a -30°C con

cinco volúmenes de éter de petróleo (Probus, España). Tras dos horas y media, a -30°C , se decantaron los sobrenadantes, y la pequeña fase inferior acuosa, congelada, que contiene la proteína precipitada, se enfrió con nitrógeno líquido y se liofilizó directamente. El liofilizado obtenido fue muy soluble en CM 2:1 y THF/agua 4:1. La precipitación de la proteína con éter de petróleo resultó ser un paso imprescindible para obtener liofilizados solubles. La liofilización directa de las fracciones obtenidas de la columna rinde proteínas muy insolubles en CM 2:1 ó THF/agua 4:1.

Preparación de liposomas de ELT y reconstitución de los proteolípidos

Los liposomas multilamelares (MLVs) y unilamelares grandes (LUVs) se prepararon a partir del ELT, como se ha descrito en el capítulo V. La reconstitución de los apoproteolípidos se llevó a cabo de acuerdo al método de Papahadjopoulos et al., 1975 (11), ligeramente modificado. Brevemente, la proteína se disolvió en CM 2:1, y sobre ésta se añadió una solución clorofórmica de ELT. Los solventes se evaporaron con la ayuda de una corriente de nitrógeno en un tubo de vidrio Pyrex, procurando que la mezcla del lípido y la proteína formen una película homogénea extendida por todo el fondo del tubo. Las trazas de solvente orgánico se eliminaron introduciendo el tubo en un liofilizador durante al menos media hora (50 mT). Luego se añadió el tampón acuoso correspondiente y se siguió el mismo procedimiento que en el caso de los liposomas sin proteína (ver capítulo V, página 233). Para la mayoría de los experimentos que se presentan en este capítulo, se utilizó una relación de 1 mg de proteína por cada 10 mg de ELT, y dos tampones acuosos diferentes: KCl 50 mM, sacarosa 10 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4 (**Tampón A**), ó KCl 50 mM, sacarosa 10 mM, ATP-Mg 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4 (**Tampón B**), a una concentración final de 20 mg de ELT/ml. Sin embargo, para la microscopía electrónica y los experimentos de FT-IR se usó una relación de 3 mg de

proteína/10 mg ELT.

Microscopía electrónica de criofractura

Las muestras de proteoliposomas se procesaron para la criofractura de la manera descrita en el capítulo V (Pág. 234).

Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

La estructura secundaria que adoptan los proteolípidos purificados cuando se reconstituyen en liposomas de ELT se examinó por FT-IR. Los proteoliposomas, con una relación proteína/lípido de 3 mg/10 mg, se prepararon en agua a una concentración de 40 mg de ELT/ml. Las muestras se introdujeron entre dos ventanas de fluoruro cálcico, dispuestas en una celda desmontable, con una longitud media de paso de 10 μm , y se analizaron en un espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier modelo 1725X de Perkin-Elmer, conectado a un ordenador personal. Cada espectro fue la media de 64 barridos a una resolución de 2 cm^{-1} . Los espectros diferencia se obtuvieron restando el espectro promedio de la muestra y el del correspondiente blanco (en este caso, agua), éste último multiplicado por un factor adecuado que permita la substracción óptima en la región entre 2500 y 1900 cm^{-1} (Cortijo et al., 1982 (12)), utilizando el *software* incorporado al ordenador. Los espectros de derivada segunda se obtuvieron a partir de los espectros diferencia, utilizando dicho *software*.

Determinación de volúmenes intraliposomales con [^{14}C]-sacarosa

Se prepararon liposomas o proteoliposomas unilamelares grandes en tampón A conteniendo [^{14}C]-sacarosa (4 $\mu\text{Ci/ml}$), y la radioactividad no encapsulada se eliminó por filtración-centrifugación (Fry et al., 1978 (13)) a través de minicolumnas rellenas con Sephadex G-25, como se indicó en el capítulo V (Pág. 235). El volumen intraliposomal (VI) fue constante durante al

menos dos horas en las presentes condiciones experimentales, y no se encontraron diferencias entre las preparaciones de liposomas y proteoliposomas, a la relación de 1 mg de proteína/10 mg de ELT usada en los ensayos de permeabilidad. El VI se calculó como se describe en el capítulo V, de acuerdo a la fórmula:

$$\text{VI} = \frac{\text{radioactividad intraliposomal}}{\text{radioactividad total} \times [\text{ELT}]}$$

Su valor promedio fue de 9.6 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de ELT.

Determinación de los flujos de calcio en liposomas y proteoliposomas

Los flujos de calcio se determinaron midiendo el $^{45}\text{Ca}^{2+}$ intravesicular tras eliminar la radioactividad no encapsulada, como se describe en el capítulo V. En estos experimentos, se añadió $^{45}\text{CaCl}_2$ (20-40 μM , 3-6 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) al tampón en el que se preparan los liposomas o proteoliposomas si el propósito fue el de medir la salida de Ca^{2+} desde el interior de las vesículas hacia el espacio extraliposomal, o a la suspensión de liposomas o proteoliposomas, preparados en tampón no radioactivo, cuando se investigó la entrada de Ca^{2+} hacia el compartimento intraliposomal. La concentración de ión Ca^{2+} intraliposomal, a un tiempo dado, se calculó de la manera descrita en el capítulo V (Pág. 240).

La salida de calcio hacia el espacio extraliposomal también se determinó siguiendo la reacción quimioluminescente de la obelina, una fotoproteína sensible al calcio. Los experimentos se llevaron a cabo en la cubeta termostatzada de un luminómetro LB 9500 c de Berthold, conectado a una registradora.

RESULTADOS

Purificación de los apoproteolípidos

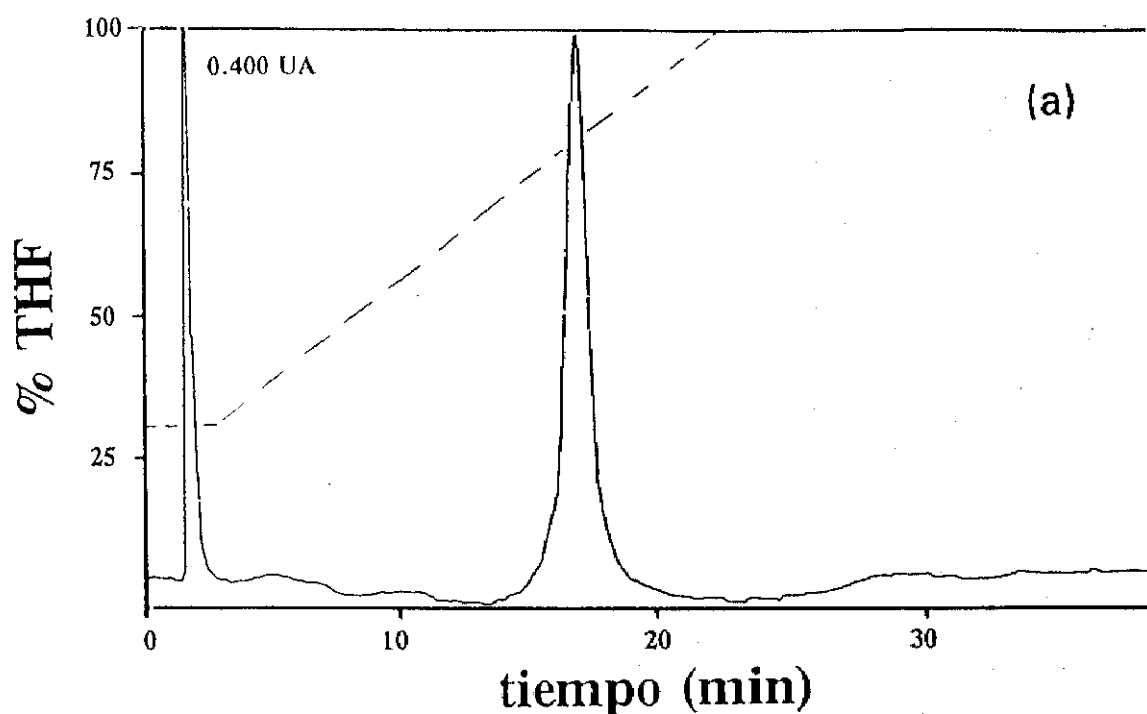
La pureza del apoproteolípido liofilizado obtenido se analizó por RP-HPLC, SDS-PAGE y HPTLC. Produjo un único pico (descontando el frente del solvente) al tiempo de retención característico de los proteolípidos cuando se recromatografió sobre la columna C3 analítica de fase reversa (capítulo III), como se ilustra en la Figura 54a. La electroforesis de la proteína sobre un gel isocrático con 14% de acrilamida (Figura 54b) reveló que está constituido exclusivamente por los proteolípidos PLP y DM20. También se detectó una banda ancha de alto peso molecular correspondiente a los agregados proteolipídicos que se forman durante el proceso de la electroforesis. El liofilizado está prácticamente desprovisto de lípidos unidos no covalentemente, a juzgar por los resultados de HPTLC (no mostrados). Únicamente sembrando gran cantidad de proteína en las placas (300 μ g) se pudieron detectar pequeñas cantidades de sulfátidos.

Caracterización morfológica de los proteoliposomas

La Figura 55 muestra una réplica de criofractura de una preparación de proteoliposomas, a una relación proteolípido/ELT de 3 mg/10 mg. La incorporación de proteína en la membrana queda patente por la aparición de partículas intramembranas, que están ausentes en las réplicas de liposomas que carecen de proteína (ver, por ejemplo, capítulo V, Figura 50).

Estructura secundaria del proteolípido reconstituido

La estructura secundaria que adopta la proteína cuando se reconstituye en liposomas de ELT se investigó por FT-IR, a partir de las frecuencias características del esqueleto polipeptídico en las bandas amida I y amida II (Figura 56). La espectroscopía infrarroja se ha aplicado con éxito para la determinación de



(b)



AGR



PLP

DM20

Figura 54.- Pureza de los proteolípidos purificados por RP-HPLC. Se fraccionaron las proteínas de mielina utilizando la columna C3 semipreparativa, como se describe en el capítulo III. Se recogió el pico correspondiente a proteolípidos, se precipitaron con éter de petróleo y se liofilizaron. (a) Recromatografía del liofilizado sobre la columna C3 analítica: 500 μ g de liofilizado disuelto en THF/agua 4:1, 0.1% TFA. (b) Composición proteica por SDS-PAGE del liofilizado, sobre un gel isocrático con 14% de acrilamida, teñido con el reactivo de plata. AGR, agregados proteolipídicos.

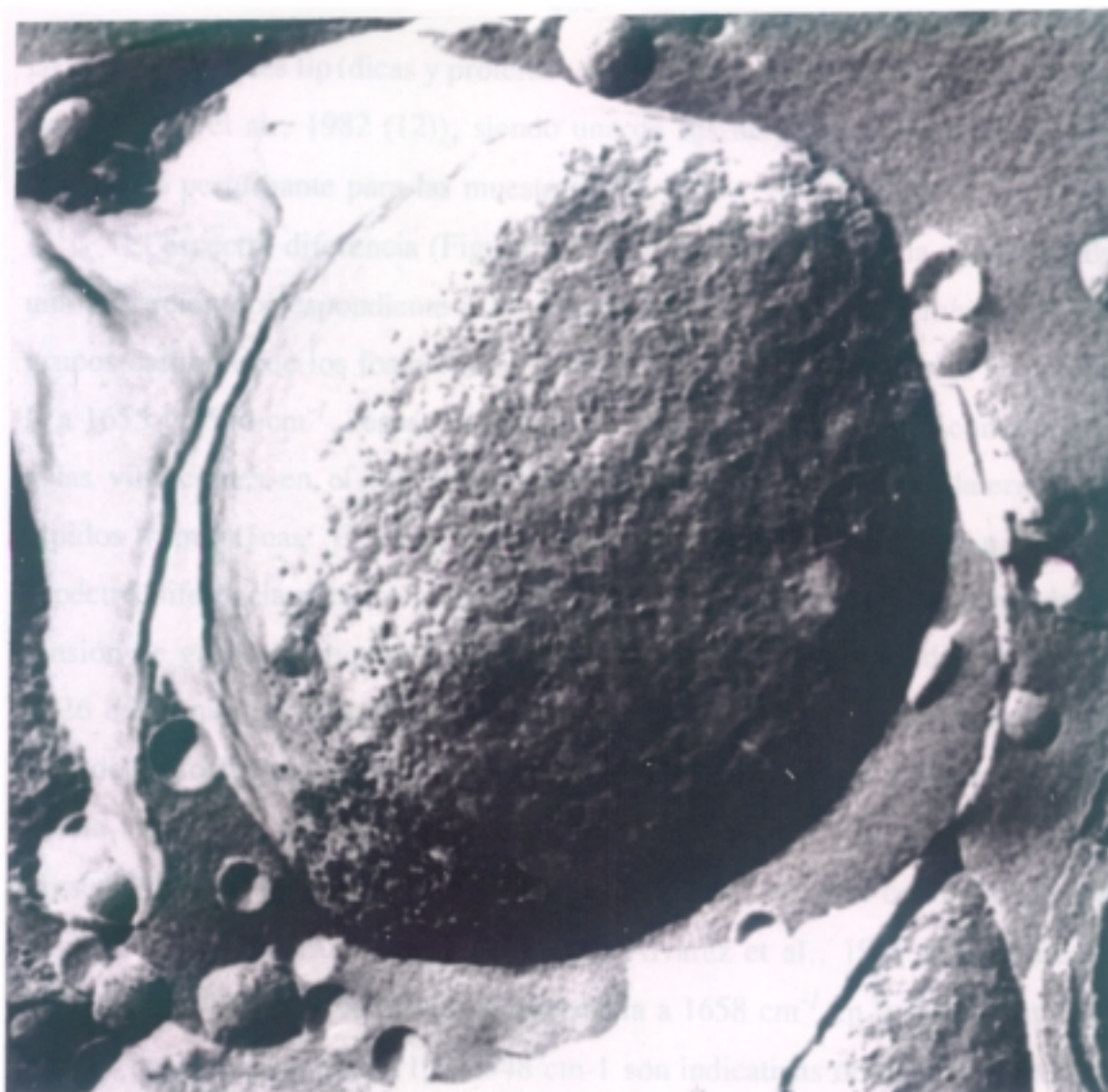


Figura 55.- Réplica de crio fractura de un liposoma de ELT con proteolípido reconstituido (3 mg de proteína/10 mg de ELT). Son visibles las partículas intramembrana. x 120.000.

las conformaciones lipídicas y proteicas en biomembranas y sistemas reconstituidos (Cortijo et al., 1982 (12)), siendo una de sus mayores ventajas el ser una técnica no perturbante para las muestras.

El espectro diferencia (Figura 56, trazo superior), revela la existencia de una absorción correspondiente a las vibraciones de tensión (*stretching*) de los grupos carbonilo de los fosfolípidos a 1730 cm^{-1} , y las bandas amida I y amida II a 1655 y 1546 cm^{-1} , respectivamente. La absorción a 1467 cm^{-1} corresponde a las vibraciones en el esqueleto hidrocarbonado de las cadenas laterales de lípidos y proteínas. El espectro de derivada segunda, obtenido a partir del espectro diferencia anterior (Figura 56, trazo inferior) muestra que la banda de tensión de grupos carbonilo fosfolipídicos se desdobra ahora en dos, a 1745 y 1726 cm^{-1} , que corresponden a las vibraciones carbonilo de las cadenas *sn-1* y *sn-2* de los fosfolípidos (Alvarez et al., 1987 (14)). Los componentes de la banda amida I aparecen a 1690 , 1681 , 1658 , 1639 y 1630 cm^{-1} . La banda amida II presenta dos componentes principales a 1548 y 1516 cm^{-1} . Por comparación con resultados previos (Susi et al., 1967 (15); Alvarez et al., 1987 (14); Amey y Chapman, 1983 (16)), la principal frecuencia a 1658 cm^{-1} en la banda amida I, junto a la frecuencia amida II a 1548 cm^{-1} son indicativas de un alto contenido en estructura alfa-helicoidal, aunque parte de la absorción a esta frecuencia también podría corresponder a estructura desordenada (*random coil*), que puede únicamente resolverse si se deutera la muestra. La presencia de componentes amida I a 1690 , 1681 , 1639 y 1630 cm^{-1} denota que también están presentes las estructuras β . El componente amida II a 1516 cm^{-1} puede asignarse a vibraciones de grupo peptídico en estructuras desordenadas y/o a la absorción de cadenas laterales de tirosina (Alvarez et al., 1987 (14)). La contribución de otro tipo de estructuras, como los giros β (β -turns), podrían estar presentes en los componentes amida I a 1690 , 1681 y 1658 cm^{-1} (Bandeekar y Krimm, 1979 (17)).

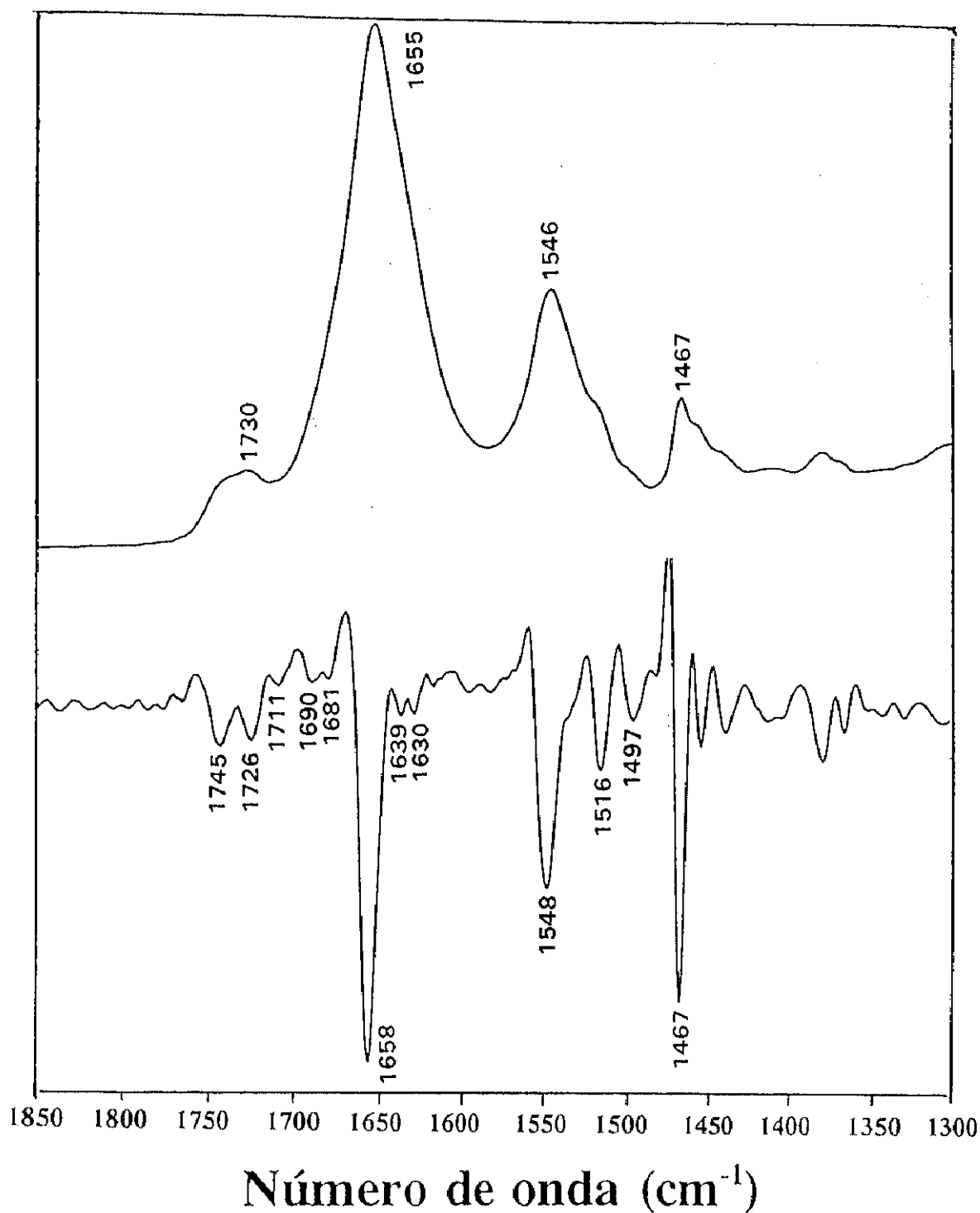


Figura 56.- Estructura secundaria del proteolípid reconstituido en liposomas de ELT, estudiada por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). El trazo superior corresponde al espectro diferencia, en la región de absorción característica de las proteínas, de una muestra de proteoliposomas conteniendo 3 mg de proteína/10 mg ELT. El trazo inferior corresponde a su segunda derivada. Las ordenadas representan unidades de absorbancia para el espectro diferencia, o unidades de absorbancia/ cm^{-2} para su segunda derivada.

Modificación de la permeabilidad al Ca^{2+} de la membrana liposomal inducida por los proteolípidos

En el capítulo V se señaló que los liposomas preparados a partir del ELT son más permeables al Ca^{2+} que a los iones monovalentes, incluidos los H^+ . En la Figura 57 se compara la permeabilidad de liposomas y proteoliposomas a este ión divalente. Liposomas y proteoliposomas se prepararon en ausencia (tampón A) o presencia (tampón B) de ATP-Mg, y se incubaron con $^{45}\text{CaCl}_2$ a 37°C . La entrada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ al compartimento intraliposomal fue similar en liposomas y proteoliposomas, lo cuál sugiere, como se señaló en el capítulo V, que ésta puede tener lugar a través de alguno de los componentes lipídicos del ELT (Tyson et al., 1976 (8); Blau y Weissmann, 1988 (9)). Ni la adición de ATP-Mg al tampón de preparación de los liposomas, ni la incorporación de la proteína a la membrana afectó sustancialmente la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} , lo cuál indica que ni el ATP ni el PLA por sí mismos son capaces de modificar el mecanismo de entrada de Ca^{2+} al espacio intraliposomal. Sin embargo, cuando se prepararon proteoliposomas en presencia de ATP-Mg (tampón B), la concentración intraliposomal de calcio alcanzada a dos tiempos de incubación diferentes (2.5 y 60 minutos) representó tan sólo alrededor del 27% de la observada en los controles, lo cuál sugiere que una interacción del nucleótido con la proteína es capaz de modificar la permeabilidad de la membrana a este ión.

La Figura 58 muestra la cinética de entrada de Ca^{2+} al espacio intravesicular de una misma preparación de proteoliposomas, en presencia o ausencia de ATP-Mg extraliposomal, añadido al medio de incubación. En los controles (sin ATP-Mg), la captación máxima de Ca^{2+} tiene lugar, aproximadamente, a los 30 minutos de incubación, alcanzando un equilibrio aparente hacia los 60 minutos. Por el contrario, en presencia de ATP-Mg 5 mM, la captación máxima de Ca^{2+} fue casi un 70% inferior a la del control.

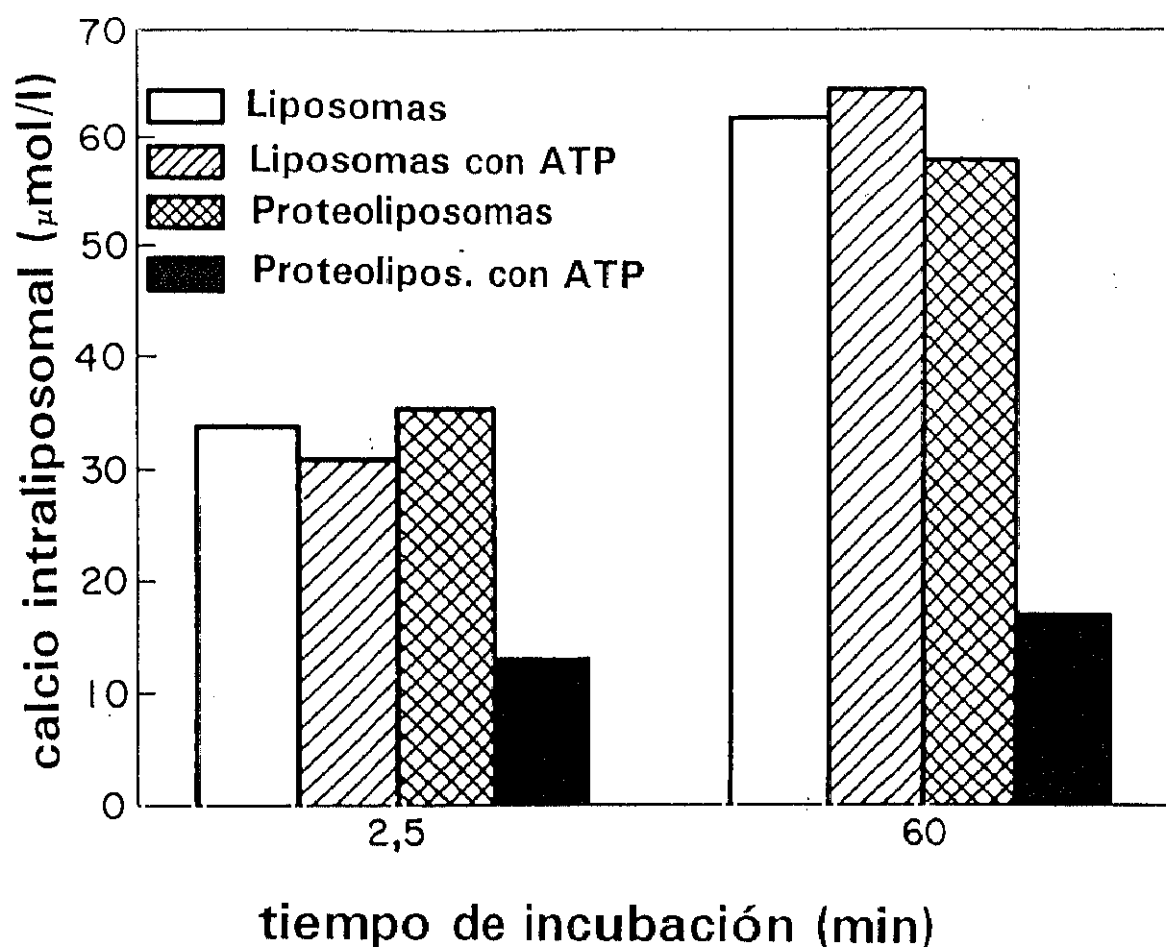


Figura 57.- Flujo de calcio hacia el interior de liposomas y proteoliposomas en ausencia o presencia de ATP-Mg intravesicular. Se prepararon liposomas y proteoliposomas en tampón A y tampón B, es decir, en ausencia y presencia de ATP-Mg 5 mM, respectivamente. El material no encapsulado se eliminó filtrando liposomas y proteoliposomas por filtración-centrifugación a través de minicolumnas de Sephadex G-25 previamente equilibradas con tampón A. Los liposomas y proteoliposomas filtrados se incubaron a 37 °C en tubos separados, y se inició el ensayo tras la adición de $^{45}\text{CaCl}_2$ 36 μM (tiempo cero). Se tomaron alícuotas de cada tubo a los 2.5 y 60 minutos y se filtraron a través de Sephadex G-25 para eliminar la radioactividad extravesicular. El calcio intravesicular se calculó como se describe en Materiales y Métodos.

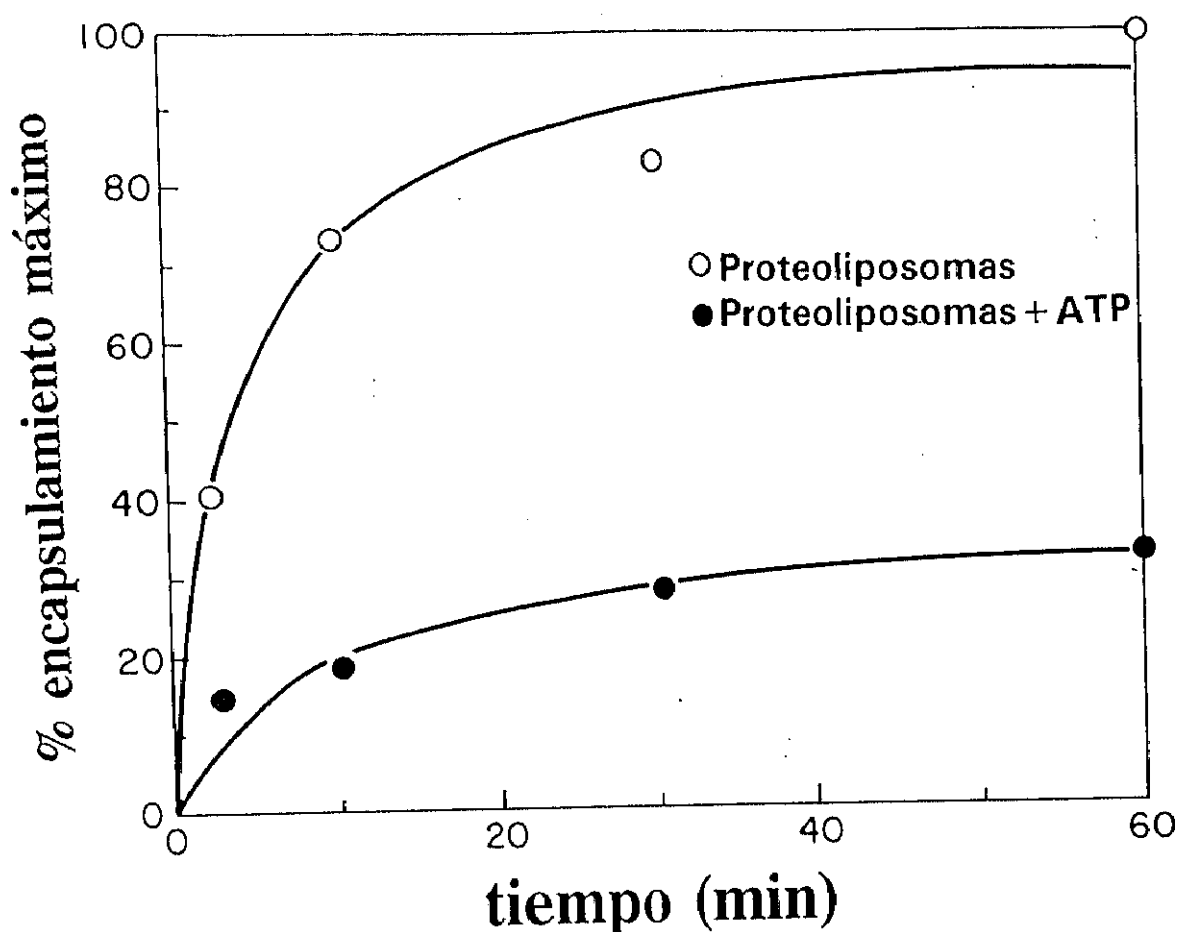


Figura 58.- Cinética de entrada de calcio al interior de los proteoliposomas: efecto del ATP-Mg extravesicular. Los proteoliposomas, preparados en tampón A y filtrados a través de Sephadex G-25, se incubaron a una concentración de 14 mg de ELT/ml en ausencia o presencia de ATP-Mg 5 mM. Tras 5 minutos, se añadió $^{45}\text{CaCl}_2$ 20 μM (tiempo cero). A los intervalos de tiempo indicados se tomaron alícuotas del medio de incubación, se filtraron a través de Sephadex G-25 y se determinó la concentración intravesicular de calcio, como se describe en **Materiales y Métodos**. Los resultados se expresan como el porcentaje del encapsulamiento máximo, que se aproximó a una concentración intravesicular de calcio de 20 μM .

En liposomas y proteoliposomas incubados en presencia de $^{45}\text{CaCl}_2$ extravesicular, la adición del ionóforo de calcio A23187 (6 μM , concentración final) produjo un abrupto incremento en volumen encapsulado de Ca^{2+} , alcanzando aproximadamente tres veces el volumen intraliposomal.

Cuando se prepararon proteoliposomas conteniendo ATP-Mg y $^{45}\text{CaCl}_2$ intravesicularmente, pudo observarse cierta salida de Ca^{2+} hacia el compartimento extraliposomal (Figura 59). Tras 5 minutos de incubación a 37 °C, aproximadamente el 35% de la radioactividad encapsulada había abandonado el espacio intravesicular, pero no se detectaron pérdidas posteriores durante al menos 60 minutos de incubación. El restante 65% debe corresponder al calcio intraliposomal, junto a cierta proporción de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ unida a fosfolípidos acídicos, orientados hacia el espacio intraliposomal, que no es accesible a los lavados extensivos y procesos de filtración utilizados en este capítulo.

Un experimento semejante al mostrado en la Figura 59 se llevó también a cabo utilizando una fotoproteína sensible al calcio, la obelina. Proteoliposomas conteniendo ATP-Mg y Ca^{2+} intravesicular se añadieron sobre tampón A conteniendo obelina, y la evolución de la luminescencia se registró utilizando un luminómetro (Figura 60). Tras la adición de los proteoliposomas pudo observarse un aumento en la tasa de luminescencia, atribuible a una salida de Ca^{2+} a partir del compartimento intraliposomal, que se estabilizó hacia los 5 minutos. La señal de luminescencia aumentó abruptamente tras la adición del ionóforo A23187, y se extinguió en su totalidad tras la adición de EGTA. Al añadir un detergente, que produce la pérdida de integridad de los liposomas, pudo observarse un destello de luz intenso y muy agudo, que podría ser atribuible a la proporción de calcio intravesicular que no es accesible al ionóforo de calcio, probablemente el calcio unido a fosfolípidos negativos. En las condiciones finales del ensayo, la adición de 5 nmol de Ca^{2+} produjo un fuerte destello de luz (no mostrado), indicando que la actividad de la obelina no se afectó por la presencia del

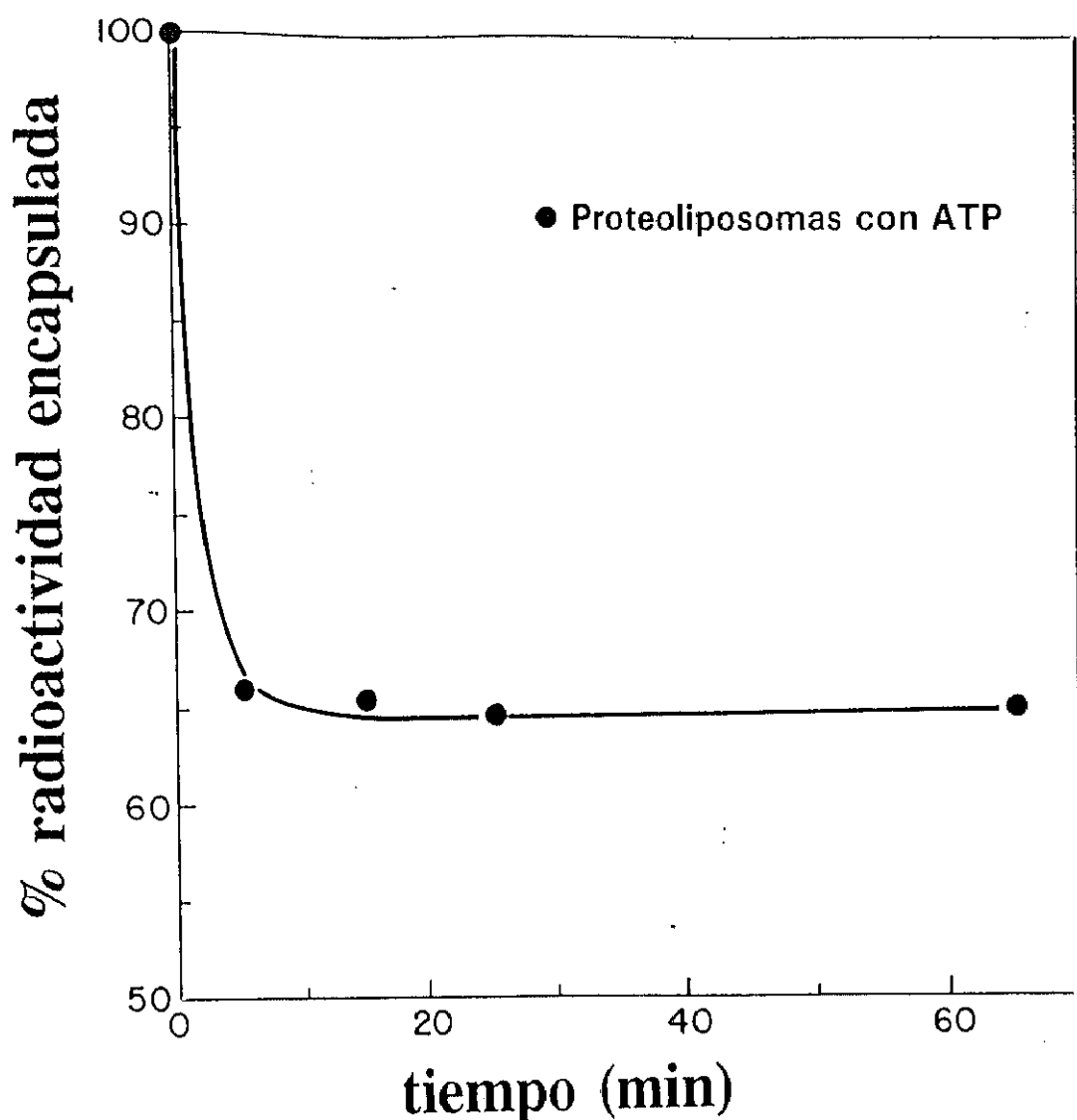


Figura 59.- Salida de calcio hacia el espacio extravésicular en proteoliposomas conteniendo ATP-Mg intravesicular. Los proteoliposomas se prepararon en tampón B conteniendo $^{45}\text{CaCl}_2$ 20 μM . La radioactividad y el ATP-Mg no encapsulados se eliminaron por filtración a través de Sephadex G-25 equilibrado con tampón A, como se describe en **Materiales y Métodos**. Se tomó una alícuota de lo eluído para medir radioactividad y colesterol (tiempo cero). A los intervalos de tiempo indicados, se tomaron alícuotas, se volvieron a filtrar a través de minicolumnas rellenas con Sephadex G-25, y se volvió a medir la radioactividad y la concentración de colesterol en alícuotas de lo eluído. La radioactividad encapsulada a cada tiempo se expresa como porcentaje con respecto a la del tiempo cero (100%).

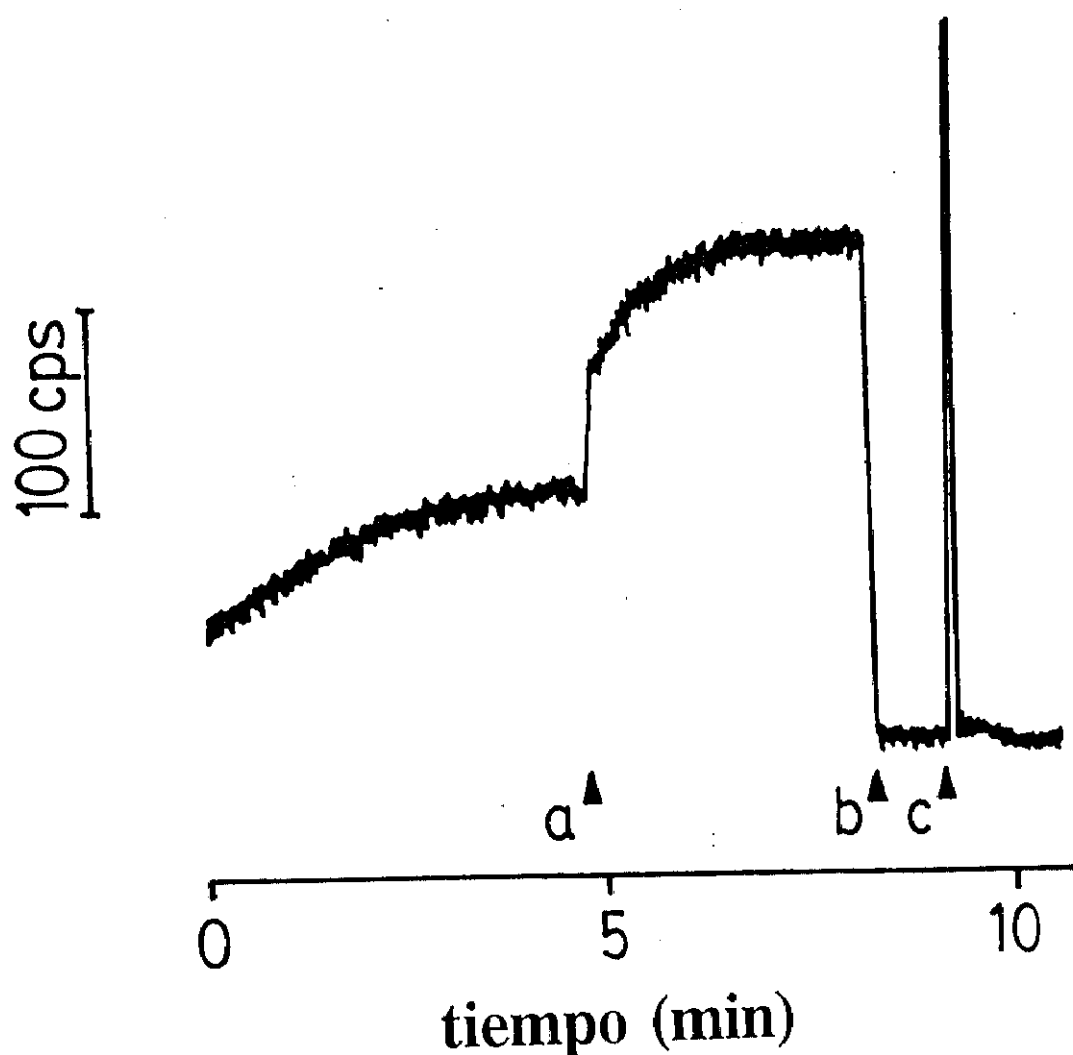


Figura 60.- Determinación de los flujos de calcio en proteoliposomas con la fotoproteína sensible al calcio obelina. Se prepararon proteoliposomas multilamelares en tampón B conteniendo CaCl_2 20 μM intravesicular. La reacción de luminiscencia se llevó a cabo en 200 μl de tampón A conteniendo 0.5 μl de obelina (aproximadamente 7×10^6 cuentas en 10 segundos bajo concentraciones saturantes de calcio), y 50 μM EGTA para extinguir la quimioluminiscencia basal. A tiempo cero, se añadieron 50 μl de la suspensión de liposomas, y seguidamente: 1 μl de A23187 1 mM (a); 1 μl de EGTA 25 mM (b); y 5 μl de Triton X-100 al 10% (c). La barra vertical indica la escala de quimioluminiscencia en cuentas por segundo.

detergente.

En otro experimento se examinó la dependencia de los efectos observados con respecto a la concentración de ATP-Mg. El experimento fue similar al mostrado en la Figura 57: se prepararon liposomas o proteoliposomas en Tampón A conteniendo distintas concentraciones de ATP-Mg, se filtraron a través de minicolumnas rellenas con Sephadex G-25, equilibradas con tampón A, para eliminar el ATP-Mg del espacio extraliposomal, y luego se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en presencia de $^{45}\text{CaCl}_2$ 20 μM . Los resultados se recogen en la Tabla I. En los liposomas control, sin proteína, no se encontró ninguna variación significativa al aumentar la concentración de ATP-Mg intravesicular, en claro contraste con lo observado para los proteoliposomas. En este caso se manifiesta claramente una disminución del Ca^{2+} encapsulado a medida que se aumenta la concentración intraliposomal de ATP-Mg.

Se probó, así mismo, la capacidad de otros nucleótidos para producir los efectos observados con el ATP-Mg (Tabla 10), en un protocolo similar al llevado a cabo en la Figura 57 y en la Tabla 9. Todos los nucleótidos probados, incluidos los análogos del ATP, AMP-PNP y AMP-PCP produjeron efectos similares, lo cual sugiere que los efectos observados tienen lugar por una interacción nucleótido-proteína, y no por una interacción específica ATP-proteína.

TABLA 9

Efecto de la concentración de ATP-Mg intraliposomal en la entrada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ al interior de liposomas y proteoliposomas

	concentración de ATP-Mg				
	0	10 μM	100 μM	1 mM	10mM
Proteoliposomas	100	79	71	62	53
Liposomas	100	97	105	97	95

Se prepararon liposomas y proteoliposomas con tampón A y ATP-Mg para obtener las concentraciones intravesiculares que se indican. Se determinó la entrada de calcio al compartimento intravesicular tras 30 minutos después de la adición de $^{45}\text{CaCl}_2$ 20 μM . Los resultados (media de tres experimentos separados) se expresan como el porcentaje de encapsulamiento de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (100% en los controles).

TABLA 10

Efecto comparativo de varios nucleótidos y análogos de ATP sobre la entrada de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ al interior de liposomas y proteoliposomas

	Concentración intravesicular de calcio (μM)						
	MgCl_2	ATP	AMP-PNP	AMP-PCP	ADP	AMP	GTP
Proteoliposomas	22 ± 3	16 ± 2	15 ± 2	10 ± 1	15 ± 3	13 ± 2	13 ± 1
Liposomas	25 ± 1	29 ± 3	31 ± 1	27 ± 2	24 ± 2	35 ± 3	23 ± 4

Se prepararon liposomas y proteoliposomas para obtener una concentración intravesicular de nucleótido-Mg de 10 mM en tampón A. Se determinó el encapsulamiento de calcio 60 minutos después de la adición de $^{45}\text{CaCl}_2$ 20 μM . Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar de tres experimentos separados.

DISCUSION

Los resultados recogidos en este capítulo vienen a confirmar un papel mucho más activo del que en un principio se había atribuido al proteolípido de mielina en el mantenimiento del equilibrio iónico en los compartimentos acuosos de la vaina de mielina. La proteína, purificada por la nueva técnica descrita en el capítulo III, libre de lípidos, induce la formación de partículas intramembrana (Figura 55) cuando se reconstituye en liposomas formados por los lípidos endógenos de la mielina (capítulo V). La formación de partículas intramembrana tras la reconstitución del PLP se demostró previamente en liposomas formados por lípidos sintéticos (Papahadjopoulos et al., 1975 (11); García-Segura et al., 1986 (18)). La existencia de partículas intramembrana también se ha demostrado en réplicas de criofractura de mielina internodal (Pinto da Silva et al., 1975 (19)). Cuando la proteína purificada se reconstituyó en los liposomas de ELT, su estructura secundaria adoptó una conformación mayoritariamente alfa-helicoidal (Figura 56), aunque también se detectó la presencia, en pequeña proporción, de estructuras en lámina β . La conformación que adopta la proteína en la membrana de los liposomas de ELT es la que podría esperarse de una proteína con varios dominios transmembrana y con alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos (ver capítulo I, Figuras 4 y 5). En trabajos previos, con proteolípidos purificados por otros procedimientos, y con lípidos con diferente composición a los utilizados aquí, también se demostró que la estructura secundaria que adopta la proteína es mayoritariamente alfa-helicoidal (Cockle et al., 1978 (20); Surewicz et al., 1987 (21); Carmona et al., 1987 (22)). Sin embargo, el proteolípido reconstituido en un extracto lipídico comercial de cerebro, de mayor semejanza con el ELT empleado en el presente capítulo, mimetizó mejor el entorno lipídico nativo de la proteína que un lípido sintético, la DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina) (Nedelec et al., 1989 (10)). Estos autores observaron evidencias de una localización y/u organización molecular diferente de los

segmentos proteicos que contienen tirosina, dependiendo de la composición lipídica de la membrana (DPPC o extracto lipídico de cerebro), lo cuál pone de manifiesto la importancia que puede tener la elección de uno u otro sustrato lipídico para la reconstitución del proteolípido purificado.

El hecho de que los proteolípidos purificados por la técnica de RP-HPLC descrita en el capítulo III adopten una estructura secundaria similar a la nativa cuando se insertan en membranas que contienen los lípidos naturales de la mielina también viene a subrayar que el método de purificación utilizado es adecuado para llevar a cabo estudios estructurales y/o funcionales con las proteínas obtenidas, siendo comparables a los proteolípidos purificados con detergentes no desnaturalizantes (capítulo IV). A este respecto, conviene mencionar que los proteolípidos disueltos en soluciones de Triton X-100 o deoxicolato adoptan también una estructura secundaria mayoritariamente alfa-helicoidal (Smith et al., 1984 (23)).

Trabajos previos habían demostrado cambios en la permeabilidad de membranas lipídicas a iones monovalentes (Ting-Beall et al., 1979 (1); Helyneck et al., 1982 (3); Cózar et al., 1987 (4)), incluidos los protones (Lin y Lees, 1982 (2)), tras la adición de la apoproteína proteolipídica. Sin embargo, nunca se había investigado la participación de esta proteína en los flujos de calcio a través de la membrana. Otros proteolípidos no mielínicos, como los de retículo sarcoplásmico, participan directamente en la translocación del ión Ca^{2+} a través de la membrana (Knowles et al., 1980 (6)). El proteolípido denominado mediatóforo, un proteolípido de membranas plasmáticas presinápticas del órgano eléctrico de *Torpedo* (Morel et al., 1991 (7)) puede únicamente ejercer su función (la liberación de acetilcolina) en respuesta a un flujo de Ca^{2+} .

Dentro de la vaina de mielina, éste ión se acumula preferencialmente en las líneas intraperiódicas (aposición de las caras extracelulares de las bicapas de mielina), donde parece jugar un papel activo en la compactación de la vaina

(Ropke et al., 1990 (5)). Además, varias clases lipídicas presentes en la membrana mielínica están directa o indirectamente relacionadas con mecanismos de translocación del ión calcio, siendo destacables los polifosfoinosítidos, muy abundantes en la membrana mielínica (Kahn y Morell, 1988 (24)), y los fosfolípidos negativos como PA, PI ó PS, que en sistemas modelo han mostrado tener capacidad ionofórica para el Ca^{2+} (Tyson et al., 1976 (8); Blau y Weissmann, 1988 (9)). Incluso el galactocerebrósido, el principal componente glicolipídico de la mielina, parece estar relacionado con la apertura de canales de calcio en la membrana de oligodendrocitos (Dyer and Benjamins, 1990 (25)).

Con todas estas premisas, se investigó la permeabilidad de los liposomas preparados con ELT al ión Ca^{2+} , con o sin proteolípidos reconstituidos. En el capítulo V se indicó que los liposomas de ELT, sin proteína, son bastante permeables al calcio, mucho más que a otros iones monovalentes (K^+ , H^+), o a la sacarosa. La Figura 57 muestra que la permeabilidad de la membrana liposomal al Ca^{2+} no se modifica por el sólo hecho de incorporar la proteína, o de encapsular ATP-Mg intraliposomalmente, pero sí cuando ambos factores confluyen: cuando se preparan proteoliposomas con ATP-Mg encapsulado, la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} disminuye muy significativamente. Estos resultados sugieren que la interacción nucleótido-proteína es la responsable de la disminución en la permeabilidad de la bicapa lipídica. A este respecto, es de destacar que en la estructura primaria del proteolípido se han encontrado sitios potenciales de unión a nucleótidos (Inouye y Kirschner, 1991 (26)). Puesto que la molécula de PLP es flexible conformacionalmente, adaptando su estructura secundaria a cambios en las propiedades físico-químicas de su entorno (Cózar et al., 1988 (27); Carmona et al., 1988 (28)), la interacción nucleótido-PLP podría traducirse en un cambio conformacional de la proteína, que afectara a los lípidos más próximos, modificando así sus propiedades de permeabilidad. Los lípidos que interactúan más íntimamente con los proteolípidos son

precisamente los lípidos aniónicos (Braun y Radin, 1969 (29), aquéllos que podrían catalizar la permeabilidad al Ca^{2+} observada en las membranas liposomales. El mecanismo por el cual éstos lípidos catalizan el transporte de ión Ca^{2+} a través de la membrana podría estar relacionado con una separación de fases dentro de la matriz lipídica, al interaccionar con el catión, y la formación de estructuras no lamelares, tales como micelas invertidas u otras estructuras intramembrana, cuya formación aumentaría la permeabilidad al calcio (Blau y Weissmann, 1988 (9)).

El efecto observado es dependiente de la concentración del nucleótido (Tabla 9), y no es específico del ATP, porque el resto de los nucleótidos ensayados tuvieron un efecto semejante al de éste (Tabla 10).

Con las dificultades inherentes a extrapolar resultados obtenidos en sistemas *in vitro* de membrana a lo que acontece en la vaina de mielina *in vivo*, los resultados que se presentan en este capítulo podrían formar parte de acontecimientos dinámicos que tienen lugar dentro de la vaina. Conviene recordar a este respecto que el otro componente proteico fundamental de la membrana mielínica, la proteína básica, también considerada durante mucho tiempo como una proteína meramente estructural, ha sido relacionada recientemente con el metabolismo de los polifosfoinosítidos, que conduce en último término a la liberación de Ca^{2+} de reservorios internos (Tompkins y Moscarello, 1991 (30)). En este trabajo se purifica una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositoles, con mayor especificidad hacia el PIP_2 , demostrando su más que probable localización en mielina. Demuestran, por técnicas inmunoenzimáticas (ELISA, *dot-blot*) la interacción específica de la enzima con la proteína básica, la cual produce una estimulación del 250% en la actividad enzimática. Esta estimulación de la actividad es, además, claramente dependiente del estado de fosforilación de la proteína básica: de todos los isómeros de carga (componentes) de la proteína básica, el que produce mayor estimulación en la actividad

de la fosfolipasa C es el menos fosforilado; el componente más fosforilado es inefectivo. El papel atribuido a la proteína básica por estos autores sería similar al desempeñado por las proteínas G en otros sistemas, esto es, como intermediaria entre un receptor muscarínico, también presentes en mielina purificada (Larocca et al., 1987 (31)), y la fosfolipasa C, que en último término conduciría a la hidrólisis de los fosfatidilinositoles y la liberación de Ca^{2+} de reservorios internos. Puesto que los reservorios internos de la vaina de mielina parecen ser las líneas intraperiódicas (Ropte et al., 1990 (5)), el proceso entero podría conducir a la liberación de Ca^{2+} hacia los compartimentos con fluido citoplasmático dentro de la vaina (líneas densas). Los resultados aquí recogidos podrían indicar que el PLP, en su interacción con nucleótidos, podría modular precisamente este último paso, modificando la permeabilidad de la membrana y evitando que se alcancen concentraciones excesivas de ión Ca^{2+} en los espacios citoplasmáticos de la vaina. Los altos niveles de Ca^{2+} en las líneas densas de la vaina podrían provocar la activación de las proteasas neutras activadas por concentraciones milimolares de Ca^{2+} (calpaína II), presentes en mielina, y capaces de hidrolizar proteínas fundamentales para el mantenimiento de la integridad de la vaina, tales como la proteína básica o la MAG (Yanagisawa et al., 1988 (32); Cibelli et al., 1989 (33); Chakrabarti et al., 1990 (34); Banik et al., 1991 (35)), lo cual podría conducir al desarrollo de alguna patología desmielinizante.

Los resultados presentados también podrían guardar relación con las profundas alteraciones encontradas en la compactación de las vainas de mielina, estudiadas por difracción de rayos X, cuando los nervios diseccionados se sumergen en soluciones acuosas conteniendo altos niveles de calcio (Blaurock et al., 1986 (36)). Cuando esto tiene lugar, se detecta una transición casi completa entre la forma "nativa" de la vaina, con espaciado característico de 150 Å, denominada AS, y una forma menos compacta, con espaciado de 177 Å,

denominada AL. El efecto es específico del ión Ca^{2+} (los iones Mg^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} son inefectivos), y la transición es más rápida y de mucha mayor proporción cuando en la solución fisiológica en que se sumerge el nervio se omite la glucosa, o se sustituye por 2-deoxi-D-glucosa, o se añade NaCN, condiciones que evitan que la fosforilación oxidativa, y por tanto, la síntesis de ATP, tenga lugar.

En suma, resultados previos han mostrado que niveles demasiado bajos (Ropte et al., 1990 (5)), demasiado altos, o incluso niveles normales de calcio (1-3 mM) en condiciones que no permiten la biosíntesis de ATP (Blaurock et al., 1986 (36)), pueden desestabilizar y desorganizar la estructura normal de la vaina. Los resultados presentados en este capítulo indican que los proteolípidos, las proteínas mayoritarias de la membrana mielínica, pueden participar directamente en el mecanismo de regulación de la concentración de ión Ca^{2+} , modificando la permeabilidad de la membrana en su interacción con nucleótidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Ting-Beall H.P., Lees M.B. y Robertson J.B. (1979). *Interactions of proteolipid apoprotein with planar lipid bilayers*. **J. Membr. Biol.** 51:33-46.
- 2.- Lin L.F.H. y Lees M.B. (1982). *Interaction of dicyclohexylcarbodiimide with myelin proteolipid*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 79:941-945.
- 3.- Helynck G., Luu B., Nussbaum J.L., Picken D., Skolidis G., Trifilieff E., Dorsselaer A.V., Seta P., Sandeaux R., Gavach C., Heitz F., Simon D. y Spach G. (1983). *Brain proteolipids. Isolation, purification and effect on ionic permeability of membranes*. **Eur. J. Biochem.** 133:689-695.
- 4.- Cózar M., Lucas M. y Monreal J. (1987). *Ionophoric properties of the proteolipid apoprotein from bovine brain myelin*. **Biochem. Int.** 14:833-841.
- 5.- Ropte S., Scheidt P. y Friede R.L. (1990). *The intermediate dense line of the myelin sheath is preferentially accesible to cations and is stabilized by cations*. **J. Neurocytol.** 19:242-252.
- 6.- Knowles A., Zimniak P., Alfonso M., Zimniak A. y Racker E. (1980). *Isolation and characterization of proteolipids from sarcoplasmic reticulum*. **J. Membr. Biol.** 55:233-239.
- 7.- Morel N., Synguelakis M. y Le Gal la Salle G. (1991). *Detection with monoclonal antibodies of a 15-kDa proteolipid in both presynaptic plasma membranes and synaptic vesicles in Torpedo electric organ*. **J. Neurochem.** 56:1401-1408.
- 8.- Tyson C.A., Zande H.V. y Green D.E. (1976). *Phospholipids as ionophores*. **J. Biol. Chem.** 251:1326-1332.
- 9.- Blau L. y Weissmann G. (1988). *Transmembrane calcium movements mediated by ionomycin and phosphatidate in liposomes with Fura 2 entrapped*. **Biochemistry** 27:5661-5666.
- 10.- Nedelec J.-F., Alfsen A. y Lavialle F. (1989). *Comparative study of myelin proteolipid apoprotein solvation by multilayer membranes of synthetic*

DPPC and biological lipid extract from bovine brain. An FT-IR investigation. **Biochimie** 71:145-151.

- 11.- Papahadjopoulos D., Vail W.J. y Moscarello M. (1975). *Interaction of a purified hydrophobic protein from myelin with phospholipid membranes: studies on ultrastructure, phase transitions and permeability.* **J. Membr. Biol.** 22:143-164.
- 12.- Cortijo M., Alonso A., Gómez-Fernández J.C. y Chapman D. (1982). *Intrinsic protein-lipid interactions. Infrared spectroscopic studies of Gramicidin A, Bacteriorhodopsin and Ca^{2+} -ATPase in biomembranes and reconstituted systems.* **J. Mol. Biol.** 157:597-618.
- 13.- Fry D.W., White J.C. y Goldman I.D. (1978). *Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution.* **Anal. Biochem.** 90:809-815.
- 14.- Alvarez J., Lee D.C., Baldwin S.A. y Chapman D. (1987). *Fourier transform Infrared spectroscopic study of the structure and conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter.* **J. Biol. Chem.** 262:3502-3509.
- 15.- Susi H., Timasheff S.N. y Stevens L. (1967). **J. Biol. Chem.** 242:5460-5466.
- 16.- Arey R.L. y Chapman D. (1983). *Infrared spectroscopic studies of model and natural biomembranes.* En (Chapman D., ed.): **Biomembrane structure and function. Topics in Molecular and Structural Biology**, vol. 4. Londres, Macmillan Press. Pp: 199-256.
- 17.- Bandekar J. y Krimm S. (1979). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:774-777.
- 18.- García-Segura L.M., De Cózar M., Moreno M.C. y Monreal J. (1986). *Freeze-Fracture characterization of proteolipid protein and basic protein of central nervous system myelin incorporated in liposomes.* **Brain Res.** 380:261-266.
- 19.- Pinto da Silva P. y Miller R.G. (1975). *Membrane particles on fracture faces of frozen myelin.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72:4046-4050.
- 20.- Cockle S.A., Epand R.M., Boggs J.M. y Moscarello M.A. (1978). *Circular dichroism studies on lipid-protein complexes of a hydrophobic myelin protein.* **Biochemistry** 17:624-629.

- 21.- Surewicz W.K., Moscarello M.A. y Mantsch H.H. (1987). *Secondary structure of the hydrophobic myelin protein in a lipid environment as determined by Fourier-transform infrared spectrometry*. *J. Biol. Chem.* 262:8598-8602.
- 22.- Carmona P., Ramos J.M., De Cózar M. y Monreal J. (1987). *Conformational features of lipids and proteins in myelin membranes using Raman and Infrared spectroscopy*. *J. Raman Spectr.* 18:473-476.
- 23.- Smith R., Cook J. y Dickens P.A. (1984). *Structure of the proteolipid protein extracted from bovine central nervous system myelin with non-denaturing detergents*. *J. Neurochem.* 42:306-313.
- 24.- Kahn D.W. y Morell P. (1988). *Phosphatidic acid and phosphoinositide turnover in myelin and its stimulation by acetylcholine*. *J. Neurochem.* 50:1542-1550.
- 25.- Dyer Ch.A. y Benjamins J.A. (1990). *Glycolipids and transmembrane signaling: Antibodies to galactocerebroside cause an influx of calcium in oligodendrocytes*. *J. Cell. Biol.* 111:625-633.
- 26.- Inouye H. y Kirschner D.A. (1991). *Folding and function of the myelin proteins from primary sequence data*. *J. Neurosci. Res.* 28:1-17.
- 27.- Cózar M., Carmona P. y Monreal J. (1988). *Conformational aspects of brain proteolipid apoprotein studied by infrared spectroscopy*. En (Schmid E.D., Schneider F.W. y Siebert F., eds.): *Spectroscopy of biological molecules*. New advances. Nueva York, John Wiley & Sons. Pp: 177-180.
- 28.- Carmona P., Cózar M., García-Segura L.M. y Monreal J. (1988). *Conformation of brain proteolipid apoprotein. Effects of sonication and n-octyl- β -D-glucopyranoside detergent*. *Eur. Biophys. J.* 16:169-176.
- 29.- Braun P.E. y Radin N.S. (1969). *Interactions of lipids with a membrane structural protein from myelin*. *Biochemistry* 8:4310-4318
- 30.- Tompkins T.A. y Moscarello M.A. (1991). *A 57-KDa phosphatidylinositol-specific phospholipase C from bovine brain*. *J. Biol. Chem.* 266:4228-4236.
- 31.- Larocca J.N., Ledeen R.W., Dvorkin B. y Makman M.H. (1987). *Muscarinic receptor binding and muscarinic receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in rat brain myelin*. *J. Neurosci.* 7:3869-3876.

- 32.- Yanagisawa K., Sato S., O'Shannessy D.J., Quarles R.H., Suzuki K. y Miyatake T. (1988). *Myelin-associated calpain II*. **J. Neurochem.** 51:803-807.
- 33.- Cibelli G., Livrea P., Simone I.L., Vitiello F., Buttiglione M. y Di Benedetta C. (1989). *Ca-activated proteolysis of myelin basic protein: an immunological study*. **Bull. Mol. Biol. Med.** 14:21-27.
- 34.- Chakrabarti A.K., Dasgupta S., Banik N.L. y Hogan E.L. (1990). *Regulation of the calcium-activated neutral proteinase (CANP) of bovine brain by myelin lipids*. **Biochim. Biophys. Acta** 1038:195-198.
- 35.- Banik N.L., DeVries G.H., Neuberger T., Russell T., Chakrabarti A.K. y Hogan E.L. (1991). *Calcium-activated neutral proteinase (CANP, Calpain) activity in Schwann cells: Immunofluorescence localization and compartmentation of μ - and mCANP*. **J. Neurosci. Res.** 29:346-354.
- 36.- Blaurock A.E., Yale J.L. y Roots B.I. (1986). *Ca-controlled, reversible structural transition in myelin*. **Neurochem. Res.** 11:1103-1129.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Entre un gran número de solventes orgánicos y sus mezclas, se encontró que las mezclas de tetrahidrofurano (THF) y agua, dependiendo de su proporción relativa, son capaces de disolver proteolípidos, y de extraer selectivamente las proteínas de mielina o de sustancia blanca de cerebro. La mezcla THF/agua 4:1 v/v disolvió totalmente los proteolípidos, el 60% de las proteínas totales de mielina, y el 100% de las mismas cuando se incluyó ácido (0.1% de ácido trifluoroacético).
- 2.- Estas mezclas constituyen una nueva fase móvil específica para la separación de las proteínas totales de mielina mediante la técnica de RP-HPLC, en virtud de su gran capacidad solubilizadora y su alto poder eluotrópico, y quizás pueda ser aplicable a otras biomembranas y a sus proteínas altamente hidrofóbicas.
- 3.- El uso de esta fase móvil en columnas C3 de ancho tamaño de poro (300 Å) ha permitido la resolución completa, a escalas analítica y semipreparativa, de las fracciones proteicas principales de la mielina: proteínas básicas, fracción Wolfgram y proteolípidos.
- 4.- El paso clave para la resolución completa de estas fracciones es la delipidación de la membrana mielínica antes de inyectar en el cromatógrafo. Un procedimiento muy útil para este fin es el simple tratamiento secuencial de la membrana purificada con tetrahidrofurano anhidro.
- 5.- De un total de ocho detergentes ampliamente utilizados en la bioquímica de membranas, dos detergentes no iónicos, Lubrol PX y octilglucósido, a concentraciones molares comparables, fueron mejores solubilizadores de mielina que los detergentes relacionados con las sales biliares, el colato sódico y el CHAPS. Los dos primeros solubilizaron más proteína que lípidos, mientras que los dos últimos solubilizaron más lípido que proteína. Los surfactantes más efectivos fueron el SDS y el Zwittergent 3-14, si bien no son adecuados cuando se pretende mantener la estructura nativa de las proteínas en solución. En condiciones de máxima solubilización, los detergentes no iónicos y el CHAPS dejaron un pequeño residuo proteico insoluble, constituido por la fracción de proteínas de mielina de alto peso molecular (fracción Wolfgram), de naturaleza citoesquelética.

- 6.- Las concentraciones de detergente requeridas para la solubilización de los componentes de la mielina se redujeron de forma sustancial al incrementar moderadamente la temperatura de extracción, y sobre todo, al aumentar la fuerza iónica del medio. Un medio de extracción muy eficaz resultó ser el tampón fosfato sódico 0.1 M, pH 6.7, conteniendo sulfato sódico 0.1 M.
- 7.- Por su alta transparencia ultravioleta, su versatilidad como agente solubilizante, su estructura química definida, su naturaleza no iónica y su alta concentración micelar crítica, el octilglucósido parece el surfactante más adecuado para la purificación y reconstitución de las proteínas de mielina en condiciones *a priori* no desnaturalizantes. El octilglucósido, a la relación detergente/proteína adecuada, reemplaza con éxito a los lípidos de la mielina en su interacción con las proteínas, recuperando éstas una estructura secundaria semejante a la nativa, según se desprende de los resultados de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier. Permite, además, la reconstitución rápida de las proteínas simplemente por dilución de los sobrenadantes de extracción, proceso que induce la formación de vesículas con los lípidos y proteínas solubilizados, como se ha demostrado por microscopía electrónica.
- 8.- Se han purificado de forma sencilla los proteolípidos de mielina en un estado altamente delipidado, combinando las propiedades de solubilización selectiva encontradas para dos de los detergentes estudiados, el CHAPS y el octilglucósido. Los tratamientos secuenciales de la mielina con CHAPS, a concentración adecuada y en condiciones óptimas de temperatura y fuerza iónica, eliminan casi totalmente los fosfolípidos, el colesterol y las proteínas básicas, rindiendo un residuo insoluble muy enriquecido en proteolípidos, proteínas de la fracción Wolfgram y glicolípidos. Al extraer este residuo, en condiciones adecuadas, con octilglucósido, se solubilizan selectivamente los proteolípidos, permaneciendo insolubles los glicolípidos y las proteínas de la fracción Wolfgram.
- 9.- Los proteolípidos así purificados, en solución de octilglucósido, parecen coexistir en distintos estados oligoméricos, en los que participan tanto el proteolípido mayoritario (PLP), como su isoforma DM20, según se desprende de los resultados de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia de Exclusión por Tamaño (SE-HPLC).
- 10.- La gran capacidad de extracción lipídica que muestra el

tetrahidrofurano, y su baja capacidad de extracción proteica cuando se minimiza la concentración de agua en el medio de extracción, ha permitido optimizar un método para la obtención de un extracto lipídico total (ELT), libre de proteína, a partir de sustancia blanca de cerebro, cuya composición cuantitativa y cualitativa es prácticamente indistinguible de la composición lipídica de la membrana mielínica. Constituye un sustrato idóneo para llevar a cabo la reconstitución de los proteolípidos purificados, o para examinar las propiedades físico-químicas y de permeabilidad de la matriz lipídica de la membrana mielínica, tras la formación de membranas artificiales (liposomas).

- 11.- Cuando el ELT se suspende en tampones acuosos, se forman espontáneamente liposomas multilamelares (MLVs), como se ha demostrado por microscopía electrónica (tinción negativa y criofractura). Si la suspensión de MLVs se sonica, la turbidez inicial de la muestra desaparece casi por completo, por la formación de liposomas unilamelares pequeños (SUVs). Cuando la suspensión de SUVs se somete a un ciclo de congelación-descongelación, el volumen intraliposomal, medido mediante el encapsulamiento de [^{14}C]-sacarosa, aumenta considerablemente, debido a la formación de liposomas unilamelares grandes (LUVs).
- 12.- Las membranas de los liposomas preparados a partir del ELT son muy poco permeables a los iones monovalentes (K^+ , H^+), pero bastante permeables al ión Ca^{2+} , según se desprende de los resultados obtenidos utilizando isótopos radioactivos y sondas fluorescentes. Interactúan fuertemente con la proteína básica de mielina, agregando de forma típicamente cooperativa, lo cuál refuerza el papel atribuido a esta proteína en la estabilización de la estructura de la vaina.
- 13.- La reconstitución de los proteolípidos purificados por RP-HPLC en liposomas de ELT induce la formación de partículas intramembrana en réplicas de criofractura. Cuando se insertan en las membranas de estos liposomas, los proteolípidos adoptan una estructura secundaria altamente alfa-helicoidal, resultados consistentes con su alto contenido en aminoácidos hidrofóbicos y su naturaleza transmembrana, y coincide con la estructura que adoptan los proteolípidos cuando se disuelven con detergentes no iónicos.
- 14.- La inserción de los proteolípidos en la membrana de liposomas preparados con ELT no modifica las propiedades de permeabilidad de la membrana al ión Ca^{2+} , porque no se aprecian diferencias

significativas entre proteoliposomas y liposomas control. Sin embargo, cuando los ensayos se realizan en presencia de ATP-Mg, se detecta una fuerte disminución de la permeabilidad al Ca^{2+} en los proteoliposomas, pero no se detecta ningún efecto en los liposomas control. El efecto fue dependiente de la concentración de ATP-Mg, y además de éste, varios otros nucleótidos fueron igualmente efectivos. Los resultados parecen indicar que la interacción nucleótido-proteolípido es la responsable de la modificación de la permeabilidad al Ca^{2+} , probablemente a través de un cambio conformacional de la proteína.

- 15.- Estos resultados ponen de manifiesto una participación activa de los proteolípidos en la regulación de los niveles de calcio dentro de los compartimentos acuosos de la vaina de mielina, de gran importancia para el mantenimiento de su estructura altamente ordenada. Alteraciones en estos mecanismos pudieran ser importantes en el desarrollo de ciertas patologías desmielinizantes, debido a la presencia en mielina de proteasas neutras activables por Ca^{2+} (calpaína II) que son capaces de hidrolizar algunos de los componentes proteicos de esta membrana, tales como la proteína básica o la glicoproteína asociada a mielina (MAG).